

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE FARMACIA  
Departamento de Microbiología II**



**FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS POR  
“ESCHERICHIA COLI” Y SU CORRELACIÓN  
CON FACTORES DE VIRULENCIA: PREVENCIÓN  
Y ACTIVIDAD DE ANTIMICROBIANOS FRENTE  
A ORGANISMOS PLANCTÓNICOS Y ASOCIADOS  
A BIOPELÍCULAS.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**Plinio Lázaro Faleiro Naves**

Bajo la dirección del doctor

Francisco Soriano García

**Madrid, 2010**

- ISBN: 978-84-692-8575-6



**Universidad Complutense de Madrid  
Facultad de Farmacia  
Departamento de Microbiología II**

**Formación de biopelículas por  
*Escherichia coli* y su correlación con  
factores de virulencia: prevención y  
actividad de antimicrobianos frente  
a organismos planctónicos y  
asociados a biopelículas**

**Tesis Doctoral**

**Plínio Lázaro Faleiro Naves**

**Madrid  
2009**





**Universidad Complutense de Madrid  
Facultad de Farmacia  
Departamento de Microbiología II**

**Formación de biopelículas por  
*Escherichia coli* y su correlación con  
factores de virulencia: prevención y  
actividad de antimicrobianos frente  
a organismos planctónicos y  
asociados a biopelículas**

**Tesis Doctoral**

**Plínio Lázaró Faleiro Naves**

**Director:  
Dr. Francisco Soriano García**

**Tutora:  
Prof. Concepción Gil García**



*Dr. Francisco Soriano García, jefe de la Unidad de Investigación en Microbiología Médica y Quimioterapia Antimicrobiana de la Fundación Jiménez Díaz – Capiro.*

*CERTIFICA:*

*Que la presente memoria titulada “**Formación de biopelículas por Escherichia coli y su correlación con factores de virulencia: prevención y actividad de antimicrobianos frente a organismos planctónicos y asociados a biopelículas**”, ha sido realizada bajo mi dirección por Plínio Lázaro Faleiro Naves en la Unidad de Investigación en Microbiología Médica y Quimioterapia Antimicrobiana de la Fundación Jiménez Díaz – Capiro. Estimando que se encuentra finalizada y en condiciones de optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid, se solicita sea admitida a trámite para su lectura y defensa pública.*

*Madrid, a 13 de Marzo de 2009*

*Dr. Francisco Soriano García*



Supported by the Programme AlBan, the European Union Programme of High Level Scholarships for Latin America, scholarship no. E05D055472BR

*“El número de estos animálculos en el sarro de los dientes de un hombre es tan grande que creo que excedería al número de hombres en un reino”*

***Antoni van Leeuwenhoek***

Informe presentado a la *Royal Society of London* en 1684, considerado como el primer informe científico sobre biopelículas





## **Agradecimientos**

Agradezco a todos los amigos que de una manera u otra han contribuido en el cumplimiento de mi reto profesional y personal de estudiar en España. A todos los miembros del excelente equipo al que he tenido la oportunidad de pertenecer por todo lo bueno que hemos compartido, gracias amigos: Alberto, Carolina, Diana, Gema, Henry, Lorena, Mati, Nieves, Rocío, Vicente y Violeta.

Gracias a los jefes del equipo: mi director de tesis, el Dr. Francisco Soriano y mi “tutora técnica”, la Dra. María del Carmen Ponte, por la imprescindible ayuda y orientación, pero sobre todo por el excelente ejemplo profesional y personal.

A todos los becarios y becarias de investigación, y a todos los otros profesionales de la Fundación Jiménez Díaz con los cuales tuve la oportunidad de colaborar.

A mi tutora Prof. Concepción Gil por su apoyo y colaboración en mi proyecto de formación.

Aos dois pilares básicos do meu projeto de formação na Espanha: A Universidade Estadual de Goiás e o Alban Office, por tornar exequível a realização do meu doutorado.

A todos os amigos e familiares no Brasil que mesmo a distância sempre me contagiaram com sua torcida e bom ânimo.



## **Dedicatoria**

Dedico esta tesis a mi razón de existir: mi familia.



## Resumen

La capacidad de cepas patógenas de *E. coli* para causar distintos tipos de infecciones extraintestinales se correlaciona con la expresión de múltiples factores de virulencia incluyendo adhesinas, toxinas, sideróforos, sistemas de secreción, formación de biopelículas y otros factores que contribuyen conjuntamente a potenciar su patogenicidad. En esta investigación se evaluaron diferentes métodos para el estudio de la capacidad de formación de biopelículas por cepas patógenas de *E. coli*, la correlación entre esa capacidad y factores de virulencia, los efectos de diferentes compuestos en la formación de biopelícula y la actividad de antimicrobianos frente a bacterias planctónicas y asociadas a biopelículas. Se observó que la metodología elegida para el estudio de formación de biopelícula por *E. coli* influye de forma muy significativa en los resultados y que algunos factores de virulencia se correlacionan con una mayor capacidad de formación de biopelículas. Además se detectó que los compuestos probados ocasionaron reducciones, en grados variables, en la capacidad de formación de biopelículas y que las bacterias asociadas a estas estructuras fueron mucho menos sensibles a la acción de los antimicrobianos que sus correspondientes células planctónicas.



## **Abstract**

The ability of pathogenic *E. coli* strains to cause different types of extra-intestinal infections is correlated with expression of multiples virulence factors including adhesins, toxins, siderophores, secretion systems, biofilm production and others factors that simultaneously contributes to increasing bacterial pathogenicity. In this work we investigated different methodologies to study the capacity of pathogenic *E. coli* strains to form biofilms, the correlation between this capacity and virulence factors, the effects of different compounds on the biofilm formation, and the antimicrobial activity against planktonic and sessile bacteria. We observed that the methodology used to study biofilm formation by *E. coli* interferes with the results in a very significant way, and that some virulence factors correlates with a greater biofilm formation capacity. It was also found that the tested compounds caused reductions, in varying degrees, in the capacity to produce biofilms and that sessile bacteria were much less sensible to antimicrobial action than their corresponding planktonic cells.





## Resumo

A capacidade das cepas patogênicas de *E. coli* para causar as distintas infecções extra-intestinais se correlaciona com a expressão de vários fatores de virulência dentre os quais se incluem adesinas, toxinas, sideróforos, sistemas de secreção, formação de biopelículas e outros fatores que conjuntamente contribuem no aumento da patogenicidade de estas bactérias. Nessa investigação se avaliaram distintos métodos para o estudo da capacidade de formação de biofilmes por cepas patogênicas de *E. coli*, a correlação entre essa capacidade e a presença de fatores de virulência, os efeitos de diferentes compostos na formação de biofilme e também a atividade de antimicrobianos contra bactérias planctônicas e associadas a biofilmes. Observou-se que a metodologia empregada no estudo da formação de biofilme por *E. coli* influencia de maneira significativa nos resultados e que alguns fatores de virulência se correlacionam com uma maior capacidade de formação de biofilmes. Além disso, detectou-se que os compostos avaliados limitaram, em níveis variáveis, o processo de formação de biofilme e que as bactérias associadas a essas estruturas eram muito menos susceptíveis a ação dos antimicrobianos que suas correspondentes células planctônicas.



## Listado de las abreviaturas más utilizadas

ExPEC: *Escherichia coli* patógena extraintestinal  
UPEC: *Escherichia coli* uropatógena  
ITU: Infección del tracto urinario  
SPE: Sustancia polimérica extracelular  
MRHA: Hemaglutinación resistente a manosa  
MSHA: Hemaglutinación sensible a manosa  
FP: Fimbria P  
FV: Factor de virulencia  
LB: Caldo Luria Bertani  
MH-II: Caldo Mueller Hinton II ajustado con cationes  
CV: Cristal violeta  
DO: Densidad óptica  
FEB: Formación Específica de Biopelícula  
SSE: Solución salina estéril  
HSA: *Human Serum Albumin* (Albúmina sérica humana)  
IBU: Sal sódica de ibuprofeno  
NAC: N-acetil-L-cisteína  
CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*  
CMI: Concentración Mínima Inhibitoria  
CMIB: Concentración Mínima Inhibitoria de Formación de la Biopelícula  
AB: *Alamar Blue* (Azul de Alamar)  
Ec: *Escherichia coli*  
EcATCC: *Escherichia coli* ATCC 25922  
AMX: Amoxicilina  
AMC: Amoxicilina / ácido clavulánico  
CIP: Ciprofloxacina  
GEN: Gentamicina  
CTX: Cefotaxima  
DE: Desviación estándar  
ufc: Unidad Formadora de Colonia



## ÍNDICE

|   |    |
|---|----|
| 1. INTRODUCCIÓN.....  | 25 |
| 1.1 <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....   | 25 |
| 1.1.1 Características microbiológicas .....   | 25 |
| 1.1.2 Hábitat .....   | 27 |
| 1.1.3 Poder patógeno .....  | 28 |
| 1.1.4 Factores de virulencia .....  | 33 |
| 1.1.5 Sensibilidad a los antimicrobianos .....  | 39 |
| 1.1.6 Prevención de las infecciones .....   | 40 |
| 1.2 BIOPELÍCULAS BACTERIANAS .....  | 41 |
| 1.2.1 Definición .....  | 41 |
| 1.2.2 Características y propiedades .....   | 41 |
| 1.2.3 Metodología para el estudio de las biopelículas .....                                   | 46 |
| 1.2.4 Biopelículas en <i>E. coli</i> . Patogenicidad y virulencia .....                       | 51 |
| 1.2.5 Papel de las biopelículas de <i>E. coli</i> en infecciones humanas .....                | 54 |
| 1.3 ESTRATEGIAS DE LUCHA FRENTE A BIOPELÍCULAS .....  | 59 |
| 1.3.1 Inhibición de formación de biopelículas .....   | 60 |
| 1.3.2 Antimicrobianos frente a microorganismos asociados a<br>biopelículas.....               | 61 |
| 2. OBJETIVOS .....  | 65 |
| 3. MATERIAL Y MÉTODOS.....  | 67 |
| 3.1 MICROORGANISMOS.....  | 67 |
| 3.2 SEROTIPADO.....   | 67 |
| 3.3 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE FACTORES DE VIRULENCIA<br>DE LA SUPERFICIE BACTERIANA ..... | 69 |
| 3.4 DETECCIÓN DE GENES DE VIRULENCIA .....  | 70 |
| 3.5 MÉTODOS PARA EL ESTUDIO DE FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA.....                                  | 74 |
| 3.5.1 Estudios preliminares .....   | 74 |
| 3.5.1.1 Protocolo de una etapa de incubación .....  | 75 |
| 3.5.1.2 Protocolo de dos etapas de incubación .....   | 76 |
| 3.5.2 Estandarización de la metodología para estudios ulteriores .....                        | 76 |
| 3.5.3 Análisis microscópicos .....  | 77 |
| 3.6 INHIBICIÓN DE LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS .....  | 78 |
| 3.6.1 Compuestos utilizados .....   | 78 |
| 3.6.2 Efectos de los compuestos en solución .....   | 78 |

|  |            |
|--|------------|
| 3.6.3 Efectos del tratamiento previo de material abiótico con los compuestos .....   | 79         |
| <b>3.7 ACTIVIDAD DE ANTIMICROBIANOS FRENTE A BACTERIAS PLANCTÓNICAS Y ASOCIADAS A BIOPELÍCULAS .....</b>   | <b>80</b>  |
| 3.7.1 Antimicrobianos .....  | 80         |
| 3.7.2 Sensibilidad a los antimicrobianos .....   | 80         |
| 3.7.3 Sensibilidad a los antimicrobianos por el método del Azul de Alamar .....  | 80         |
| 3.7.3.1 Correlación entre el porcentaje de metabolismo del Azul de Alamar y recuentos bacterianos.....   | 82         |
| 3.7.3.2 Sensibilidad de las bacterias planctónicas .....   | 82         |
| 3.7.3.3 Sensibilidad de las bacterias asociadas a biopelícula .....  | 83         |
| <b>3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....</b>   | <b>84</b>  |
| <b>4. RESULTADOS .....</b>   | <b>87</b>  |
| <b>4.1 SEROTIPADO Y CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS FACTORES DE VIRULENCIA DE LA SUPERFICIE BACTERIANA.....</b>  | <b>87</b>  |
| <b>4.2 DETECCIÓN DE GENES DE VIRULENCIA .....</b>  | <b>88</b>  |
| <b>4.3 MÉTODOS PARA EL ESTUDIO DE FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS .....</b>  | <b>92</b>  |
| <b>4.3.1 Estudios preliminares .....</b>   | <b>92</b>  |
| 4.3.1.1 Densidades ópticas del crecimiento .....   | 92         |
| 4.3.1.2 Densidades ópticas de las bacterias adheridas a los pocillos .....   | 94         |
| 4.3.1.3 Aplicación de diferentes fórmulas para cuantificar las biopelículas ...  | 96         |
| <b>4.3.2 Estandarización de la metodología para estudios ulteriores .....</b>  | <b>99</b>  |
| <b>4.3.3 Correlación entre la capacidad de formación de biopelícula y factores de virulencia .....</b>   | <b>100</b> |
| <b>4.3.4 Análisis microscópicos .....</b>  | <b>103</b> |
| <b>4.4 INHIBICIÓN DE LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS .....</b>  | <b>107</b> |
| <b>4.4.1 Efectos de los compuestos en solución .....</b>   | <b>107</b> |
| 4.4.1.1 Sobre el crecimiento bacteriano .....  | 107        |
| 4.4.1.2 Sobre la formación de biopelícula .....  | 107        |
| <b>4.4.2 Efectos del tratamiento previo del material abiótico con los compuestos .....</b>   | <b>109</b> |
| 4.4.2.1 Sobre el crecimiento bacteriano .....  | 109        |
| 4.4.2.2 Sobre la formación de biopelícula .....  | 110        |
| <b>4.5 ACTIVIDAD DE ANTIMICROBIANOS FRENTE A BACTERIAS PLANCTÓNICAS Y ASOCIADAS A BIOPELÍCULA .....</b>  | <b>112</b> |
| <b>4.5.1 Sensibilidad de las cepas a los antimicrobianos .....</b>   | <b>112</b> |
| <b>4.5.2 Sensibilidad de las bacterias planctónicas y asociadas a biopelícula a los antimicrobianos determinada por el método del Azul de Alamar .....</b> | <b>114</b> |
| 4.5.2.1 Correlación entre el metabolismo del Azul de Alamar y recuentos bacterianos .....  | 114        |
| 4.5.2.2 Efectos de los antimicrobianos en bacterias planctónicas y asociadas a biopelícula por el método del Azul de Alamar.....                           | 115        |

|   |            |
|---|------------|
| 4.5.2.3 Comparación de la actividad de los antimicrobianos frente a bacterias asociadas a biopelículas y planctónicas ..... | 127        |
| <b>5. DISCUSIÓN.....</b>  | <b>131</b> |
| <b>6. CONCLUSIONES.....</b>   | <b>147</b> |
| <b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>   | <b>149</b> |
| <b>8. ANEXOS .....</b>  | <b>163</b> |





## 1. INTRODUCCIÓN

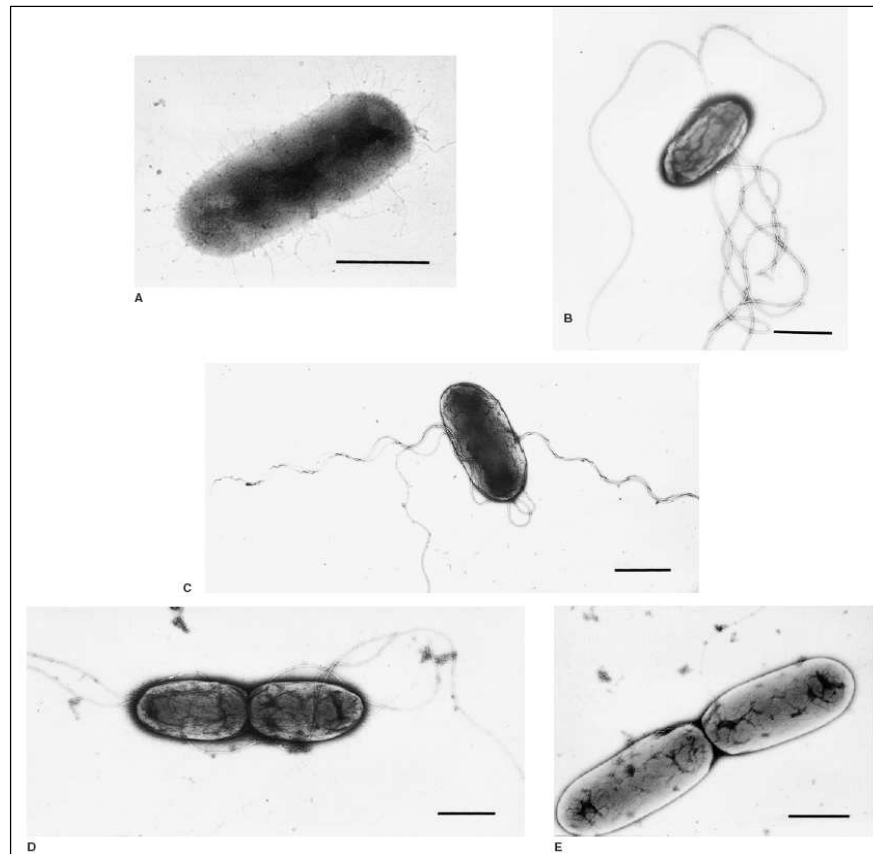
### 1.1 *ESCHERICHIA COLI*

#### 1.1.1 Características microbiológicas

En 1885 Theodore Escherich, un pediatra alemán, describió por primera vez una bacteria encontrada en las heces de neonatos y niños sanos la cual denominó *Bacterium coli commune*. Posteriormente, en 1919 Castellani y Chalmers la denominaron *Escherichia coli* en su homenaje y desde entonces ha sido uno de los seres vivos más estudiados, de hecho gran parte de los conocimientos sobre la biología celular fueron adquiridos en estudios con este microorganismo (Donnenberg, 2002).

Según el Manual Bergey de bacteriología sistemática son bacterias Gram negativas cilíndricas con 1,1 – 1,5 µm de diámetro por 2,0 – 6,0 µm de largo que se disponen aisladas o en parejas. Conforme a la definición general de la familia *Enterobacteriaceae* a la que pertenecen, son bacterias quimioheterótrofas facultativas teniendo los metabolismos fermentativo y respiratorio, no forman esporas, están desprovistas de oxidasa, producen catalasa y β-galactosidasa, pueden ser móviles por flagelos peritricos o inmóviles y normalmente reducen nitrato a nitrito.

El género *Escherichia* comprende cinco especies distintas: *E. coli*, *E. hermanni*, *E. fergusonii*, *E. vulneris* y *E. blattae* (figura 1). La especie tipo es *E. coli*, además es la única de las cinco con significación clínica. No obstante, *E. hermanni*, y *E. vulneris* han sido involucradas en infecciones de heridas aunque de manera muy ocasional (Blanco et al., 2002).



**Figura 1.** Fotomicrografías electrónicas de *E. blattae* (A), *E. coli* (B), *E. fergusonii* (C), *E. Herman* (D) y *E. vulneris* (E). Barra = 1  $\mu$ m. (Scheutz y Strockbine, 2005).

El estudio de distintas reacciones bioquímicas puede ayudar en la diferenciación entre las especies. Las principales pruebas fisiológicas que distinguen *E. coli* de las demás especies son producción de indol, reacción negativa para el citrato de Simmons, producción de lisina descarboxilasa, y fermentación de glucosa, lactosa y D-manitol (Scheutz y Strockbine, 2005).

### **1.1.2 Hábitat**

*E. coli* es la especie predominante de la microbiota aerobia y facultativa del tracto gastro-intestinal de los animales de sangre caliente y se elimina por las heces al exterior. A pesar de ser el microorganismo facultativo predominante representa una muy pequeña proporción del contenido total de bacterias en este sitio anatómico. (Blanco et al., 2002; Todar, 2008).

Algunos anaerobios como *Bacteroides spp.* son, al menos, veinte veces más abundantes que *E. coli* en el intestino grueso. Sin embargo por su presencia regular en el intestino y en las heces, *E. coli* es utilizada como indicador de contaminación fecal. Se puede encontrar en el medio ambiente ya que es capaz de sobrevivir algunos días en el agua y los alimentos, de manera que su aislamiento es un indicador de contaminación fecal reciente (Blanco et al., 2002; Todar, 2008).

El intestino humano es colonizado por *E. coli* en las primeras 40 horas tras el nacimiento, siendo la bacteria ingerida en agua y alimentos u obtenida directamente de otros individuos en contacto con el recién-nacido. La bacteria se adhiere al moco que recubre el intestino grueso y una vez establecida una

misma cepa puede persistir indefinidamente, aunque constituya solo aproximadamente el 0,1% de la población total (Prescott, 2002; Todar, 2008).

### **1.1.3 Poder patógeno**

*E. coli* es una especie bacteriana de considerable importancia científica, económica y médica. Están incluidas en esta especie cepas no patógenas y otras que son capaces de causar enfermedades entéricas y diversos tipos de infecciones extraintestinales en humanos y animales (Johnson, 2002a).

La mayoría de las cepas intestinales de *E. coli* no son patógenas y coexisten en armonía con el hospedador, algunas incluso lo benefician sintetizando cofactores y hasta lo protegen de la invasión por microorganismos patógenos (Todar, 2008).

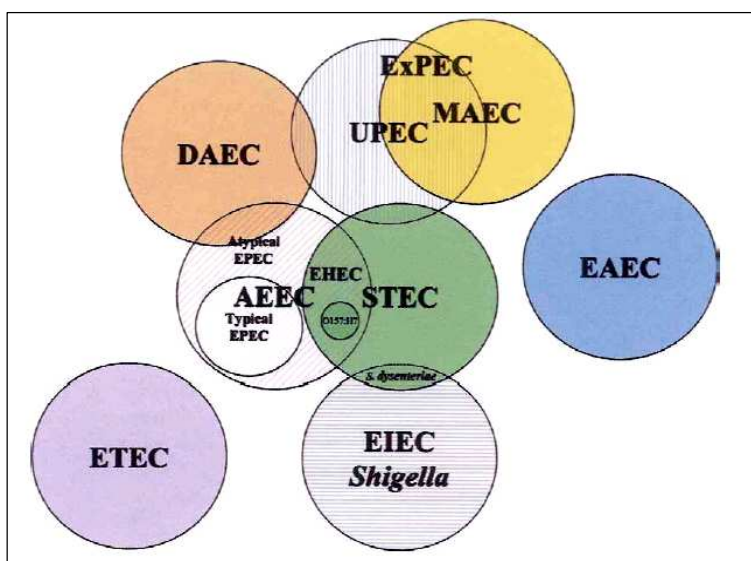
No obstante, algunas cepas son patógenas y pueden producir infecciones entéricas (diarrea, disentería, colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico) o extraintestinales (infecciones urinarias, bacteriemias o septicemias, meningitis, peritonitis, abscesos, mastitis, infecciones pulmonares y de heridas). *E. coli* provoca en seres humanos del orden de 630 millones de casos de diarrea en el mundo y aproximadamente 775.000 muertes al año, afectando fundamentalmente a la población infantil de países en desarrollo. Además, es el patógeno oportunista más frecuentemente asociado con infecciones urinarias y septicemias en humanos (Blanco et al., 2002).

Por lo general las cepas de *E. coli* patógenas utilizan múltiples mecanismos de manera similar a las otras bacterias que infectan mucosas, con

las etapas de adhesión y colonización de la mucosa, evasión de los mecanismos de defensa, multiplicación y daño tisular (Kaper et al., 2004).

El tipo de interacción resultante entre microorganismo y hospedador, permite clasificar las cepas de *E. coli* como comensales avirulentos, como patógenos oportunistas o altamente especializados, que a su vez son frecuentemente clasificados en patotipos de acuerdo con el tipo de enfermedad que causan y por su conjunto de factores de virulencia (Sousa, 2006).

Se han descrito un gran número de patotipos de *E. coli*. La similitud de los nombres dados a los diferentes tipos, las inconsistencias en el uso de una única nomenclatura en la literatura, el avance en los conocimientos de la patogénesis y la emergencia de nuevos patotipos han contribuido a la complejidad de la nomenclatura de estas cepas. En la figura 2 se ilustran los distintos patotipos y la relación compleja entre ellos (Donnenberg, 2002).



**Figura 2.** Esquema ilustrando las complejas relaciones entre los diferentes patotipos de *E. coli* que causan enfermedades en seres humanos.

Entre las cepas de *E. coli* patógenas extraintestinales (ExPEC) están incluidas las cepas de *E. coli* asociadas a meningitis (MAEC, en amarillo) y las uropatógenas (UPEC, rayas verticales). Esas cepas comparten muchos factores de virulencia, además algunos clones pueden causar ambos tipos de infección. Dentro de las UPEC, algunas cepas exhiben la adherencia difusa a células en cultivo y comparten los mismos tipos de adhesinas con *E. coli* con adherencia difusa (DAEC, naranja). DAEC es un patotipo heterogéneo que ha sido epidemiológicamente vinculado a síndromes diarreicos y hay publicaciones de aislamiento de este patotipo de individuos con infección urinaria y diarrea simultánea.

También hay comunicaciones de cepas de *E. coli* productoras de toxina Shiga (STEC, verde) causando infecciones urinarias. Ese patotipo es caracterizado por la producción de las toxinas Shiga que usualmente son codificadas por bacteriófagos y dentro de ese grupo hay cepas que también son capaces de adherirse a las células epiteliales, borrar el microvilli intestinal y provocar la condensación de la actina del citoesqueleto lo que ocasiona la aparición de un pedestal en forma de copa sobre el que descansa la bacteria, propiedad que define la cepa de *E. coli* adherente y borradora (AEEC, rayas diagonales).

Tales cepas, cuando son STEC y a la vez AEEC, son identificadas como *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC). El serotipo encontrado dentro de ese patotipo es el O157:H7. Las cepas AEEC que no producen las toxinas Shiga son referidas como *E. coli* enteropatógenas (EPEC). Dentro del patotipo EPEC, muchas cepas producen la adhesina BFP (*bundle-forming pilus*) lo que permite

una adhesión tipo localizada a células en cultivo y caracteriza el grupo como EPEC típico, mientras que las cepas que no se adhieren con el mismo patrón son identificadas como EPEC atípicas, además hay algunas EPEC atípicas que exhiben una adherencia difusa.

Las cepas de *E. coli* enteroinvasivas (EIEC, rayas horizontales) invaden células en cultivo, se multiplican en su citoplasma y se diseminan célula a célula. En este patotipo están incluidas cepas que son comúnmente clasificadas en el género *Shigella*. Cepas identificadas como *S. dysenteriae* producen toxinas Shiga y de esta forma pueden ser incluidas en los patotipos EIEC y STEC.

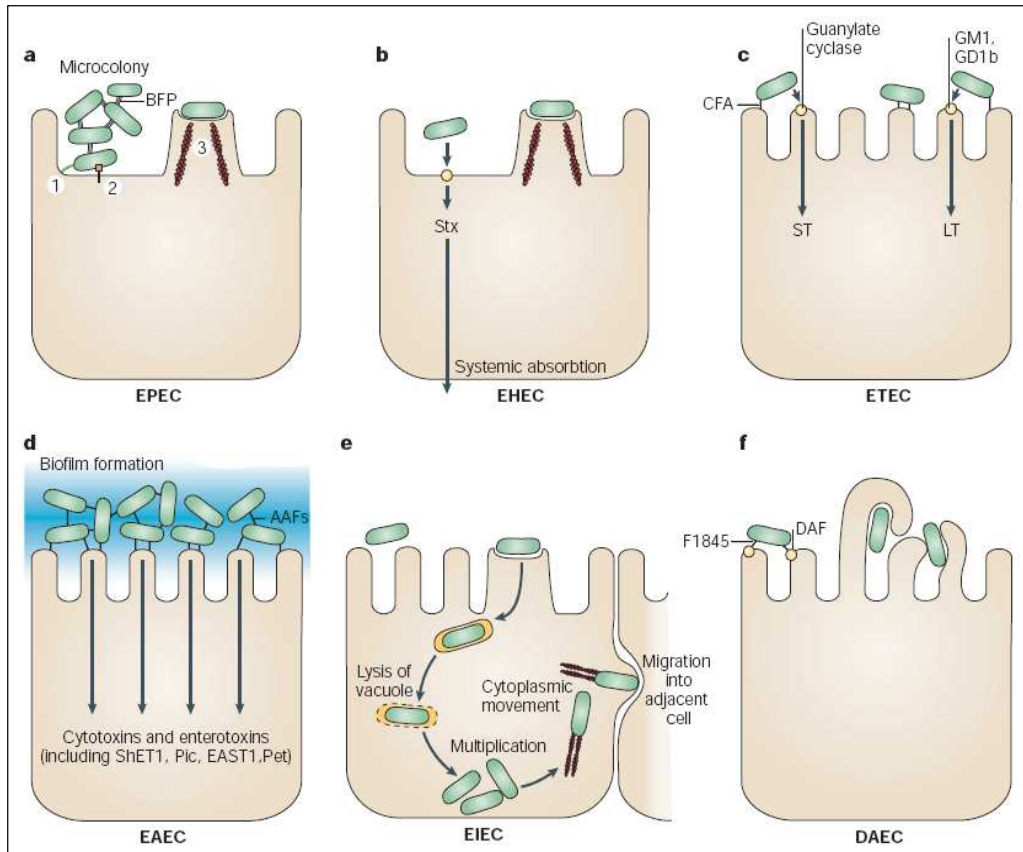
*E. coli* enteroagregativas (EAEC, azul) constituyen un patotipo heterogéneo definido por su tipo de adherencia y que causa diarrea aguda y persistente. Las cepas de *E. coli* enterotoxigénicas (ETEC, violeta) producen enterotoxinas termo-lábiles y/o termo-estables que causan diarrea aguda.

Los síndromes clínicos son clasificados como enfermedad entérica/diarreica, infección del aparato urinario o sepsis/meningitis. Entre los patógenos intestinales hay seis categorías de *E. coli* bien descritas: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) y *E. coli* con adherencia difusa (DAEC) (Kaper et al., 2004).

Los seis patotipos intestinales de *E. coli* tienen características únicas en sus interacciones con las células eucarióticas. En la figura 3 están



representadas las interacciones de cada patotipo con sus células diana (Kaper et al., 2004).



**Figura 3.** Esquemas de la patogenicidad de los patotipos intestinales de *E. coli* (Kaper et al., 2004).

Las cepas que causan los síndromes extraintestinales son genéricamente denominadas como *E. coli* extraintestinales (ExPEC) siendo clasificadas como cepas *E. coli* uropatógenas (UPEC) y *E. coli* asociadas a meningitis (MAEC). Los distintos patotipos de *E. coli* tienen una tendencia a formar grupos clonales que son caracterizados por compartir determinados

tipos de antígenos O y H lo que los clasifica como serotipos o como serogrupos cuando comparten solo los antígenos O (Kaper et al., 2004).

La diversidad de mecanismos patogénicos de esa bacteria en individuos aparentemente sanos es atribuida a la propiedad de una gran variedad de factores de virulencia específicos (Donnenberg, 2002; Johnson, 2002a; Scheutz y Strockbine, 2005).

#### **1.1.4 Factores de virulencia**

La capacidad de las cepas patógenas de *E. coli* para causar los distintos tipos enfermedades intestinales y extraintestinales procede de la expresión de múltiples factores de virulencia incluyendo adhesinas, toxinas, sideróforos y sistemas de secreción, entre otros (Blanco et al., 2002; Johnson, 2002a).

Esos factores no son necesarios para la replicación vegetativa y tampoco para el simple comensalismo, pero contribuyen al aumento de eficacia en la colonización de superficies específicas del hospedador, evasión de las defensas inmunológicas, o daño directo a sus células y tejidos lo que resulta en el establecimiento de la enfermedad (Johnson, 2002a).

La virulencia bacteriana es un fenómeno multifactorial. Las cepas patógenas de *E. coli* poseen diferentes tipos de factores de virulencia que contribuyen conjuntamente a potenciar su patogenicidad (Blanco et al., 2002). La expresión de factores de virulencia específicos confiere una creciente capacidad de adaptación a nuevos nichos y permite causar un largo espectro de enfermedades (Kaper et al., 2004).

Así, las cepas ExPEC que son caracterizadas por la diversidad de factores de virulencia que poseen, pueden causar infecciones en una diversidad de sitios extraintestinales, tales como el tracto urinario, corriente sanguínea, meninges, cavidad peritoneal y pulmones (Russo y Johnson, 2003).

Las cepas de *E. coli* uropatógenas (UPEC) son las causantes de infecciones extraintestinales mas comunes entre las ExPEC. Aunque solo seis serogrupos causan el 75% de las infecciones urinarias y que muchas de las cepas parecen ser clonales, no hay un único perfil fenotípico que cause estas infecciones (Kaper et al., 2004).

Los distintos patotipos de *E. coli* tienden a ser grupos clonales que son caracterizados por compartir determinados tipos de antígenos. Se define serogrupo como el conjunto de cepas que comparten una variedad antigénica teniendo en cuenta solo los antígenos O (lipopolisacáridos); por otro lado los serotipos son definidos por la combinación de los antígenos O y H (flagelar) y a veces del antígeno capsular o K (Kaper et al., 2004).

En la tabla 1 se presentan los factores de virulencia de las cepas UPEC que son de dos tipos principales; aquellos expresados en la superficie celular y que desempeñan funciones de adhesión e invasión de tejidos además de formación de biopelícula e inducción de citocinas y aquellos producidos dentro de la célula bacteriana y que son exportados al sitio de infección (Emődy et al., 2003).

**Tabla 1.** Factores de virulencia de las cepas de *E. coli* involucradas en infecciones urinarias.

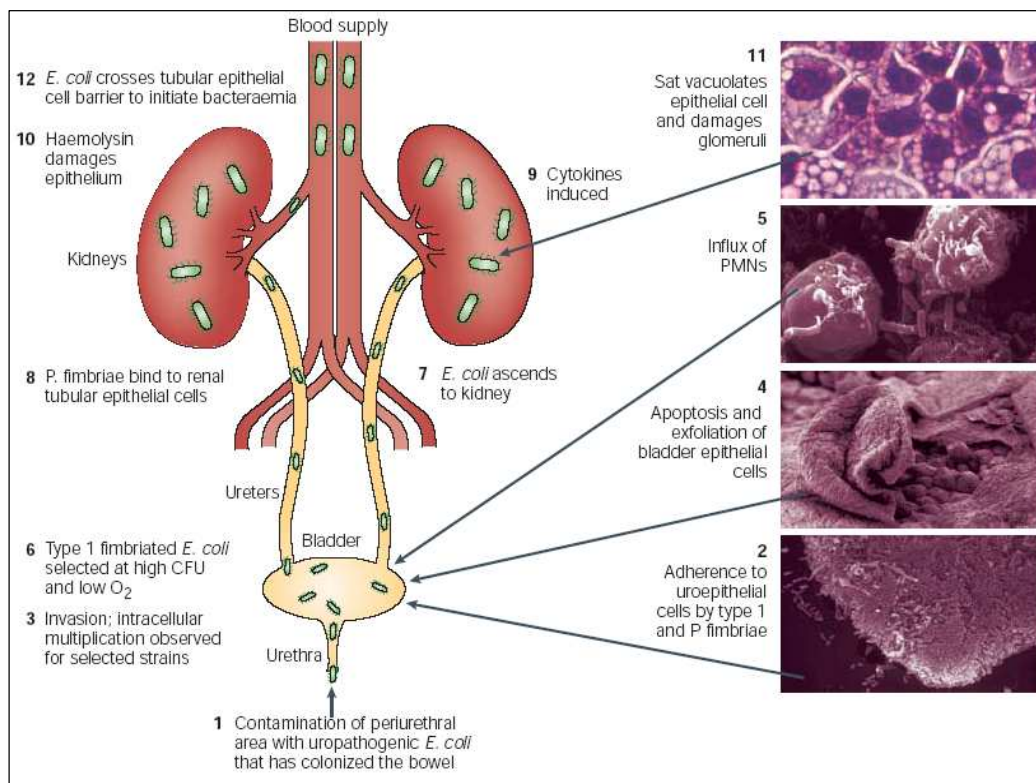
| <b>Factor de virulencia</b>         | <b>Función</b>   |
|-------------------------------------|--|
| <b>Superficie</b>                   |  |
| Fimbria tipo 1                      | Adhesión al epitelio de la mucosa y a la matriz tisular, invasión, formación de biopelícula      |
| Fimbria P                           | Adhesión al epitelio de la mucosa y a la matriz tisular, inducción de citocinas                  |
| Fimbria S                           | Adhesión a las células de la mucosa, células endoteliales y a la matriz tisular                  |
| Fimbria F1C                         | Adhesión a las células de la mucosa y endoteliales   |
| Curli                               | Adhesión a las células de la mucosa y a la matriz tisular, formación de biopelícula              |
| Flagelo                             | Movilidad  |
| Cápsula                             | Efectos antifagocitario y anticomplemento, resistencia sérica, evasión del reconocimiento inmune |
| Lipopolisacárido                    | Efectos endotóxicos, antígeno O, inducción de citocinas, resistencia sérica, inmunoadyuvante     |
| Proteínas de membrana externa       | Receptor y transporte  |
| <b>Exportado</b>                    |  |
| $\alpha$ -hemolisina                | Citotoxicidad, hemólisis   |
| Factor citotóxico necrotizante 1    | Interferencia en la fagocitosis y apoptosis  |
| Toxina secretada autotransportadora | Citotoxicidad  |
| Toxina dilatadora citoletal         | Citotoxicidad  |
| Citolisina A                        | Citotoxicidad  |
| Enterobactina                       | Captación de hierro  |
| Aerobactina                         | Captación de hierro  |
| Yersiniabactina                     | Captación de hierro  |

Adaptado de Emődy et al., 2003.

Otra importante característica reside en el hecho de que distintos subgrupos de cepas UPEC presentan diferentes combinaciones de factores de

virulencia que participan en la etiología de las infecciones del aparato urinario, tales como adhesinas específicas, incluyendo las fimbrias P (Pap), tipo 1 y otras fimbrias (F1C, S, M y Dr), además de toxinas como hemolisina, factor citotóxico necrotizante y de la proteasa autotransportada Sat (Kaper et al., 2004).

La figura 4 representa la patogénesis de las infecciones del tracto urinario causadas por las cepas de *E. coli* uropatógenas.



**Figura 4.** Patogénesis de las infecciones del tracto urinario causadas por las cepas de *E. coli* uropatógenas (Kaper et al., 2004).

- (1) Contaminación de la región periuretral con cepas UPEC procedentes del intestino grueso;
- (2) Adherencia a las células uroepiteliales mediada por las fimbrias tipo 1 y P;
- (3) Invasión y multiplicación intracelular observada para algunas cepas;
- (4) Apoptosis y

exfoliación de las células del epitelio de la vejiga; (5) Atracción de polimorfonucleares; (6) Selección de elevado número bacterias que expresan fimbrias tipo 1 y baja tensión de O<sub>2</sub>; (7) Las cepas de *E. coli* ascienden hacia los riñones; (8) Las fimbrias tipo 1 se ligan a los receptores de las células epiteliales de los túbulos renales; (9) Inducción de citocinas; (10) Hemolisina daña el epitelio; (11) Vacuolización de las células epiteliales y daño de los glomérulos por la toxina sat y (12) Cepas de *E. coli* atraviesan la barrera del epitelio tubular e inician un cuadro de bacteriemia.

El principal factor de virulencia de las cepas uropatógenas de *E. coli* es la fimbria P que está presente en la mayor parte de las cepas aisladas de pacientes con pielonefritis y urosepsis (Blanco et al., 2002). Esta fimbria permite a la bacteria fijarse a los receptores celulares y colonizar el epitelio urinario (Blanco et al., 2002; Emődy et al., 2003).

Otra adhesina importante es la fimbria S que se ha asociado especialmente con cepas causantes de septicemias y meningitis. Muchas UPEC expresan conjuntamente las fimbrias P y S. Dichas fimbrias están codificadas en los operones cromosómicos *pap* y *sfa* respectivamente (Blanco et al., 2002).

Las fimbrias curli están presentes en aproximadamente el 50% de las cepas UPEC siendo óptimamente expresadas a temperatura ambiente por lo que se han correlacionado con la colonización de la región perineal, lo que posibilitaría una ITU subsecuente (Emődy et al., 2003).

Los factores de virulencia que son exportados desempeñan varios papeles biológicos en la etiología de las infecciones por UPEC. Sus actividades incluyen el aumento en la disponibilidad y captación de hierro, invasión celular por medio de la lisis y ruptura de la capa de mucina y del epitelio, así como la

modulación e inducción del ciclo celular, reacciones inflamatorias y apoptosis (Johnson, 1991; Blanco et al., 2002; Emődy et al., 2003; Kaper et al., 2004).

La  $\alpha$ -hemolisina es una toxina secretada por *E. coli* que lisa eritrocitos ocasionando la liberación de hierro y otros nutrientes necesarios para el crecimiento bacteriano (Johnson, 1991; Blanco et al., 2002). Las funciones del factor citotóxico necrotizante 1 (CNF1) en las ITU aún permanecen controvertidas, pero ya se demostró que esa toxina induce la apoptosis de células epiteliales de vejiga *in vitro* y que disminuye la fagocitosis por polimorfonucleares. En contraste, otros autores no observaron atenuación de ITU ascendentes en modelos murinos con cepas de *E. coli* CNF1 negativas (Oelschlaeger et al., 2002).

La toxina secretada autotransportadora está asociada con las cepas de *E. coli* pielonefriticas y tiene actividad tóxica contra líneas celulares de origen renal o de vejiga. La producción de la toxina dilatadora citoletal y de citolisina A también ha sido detectada en cepas UPEC. La primera de las toxinas bloquea el ciclo celular y la segunda causa apoptosis de células hospedadoras, pero sus funciones en las ITU aún no están del todo elucidadas (Emődy et al., 2003).

En las infecciones extraintestinales, el hierro se convierte en uno de los principales factores que limitan el crecimiento bacteriano y para poder incorporarlo la mayoría de las ExPEC posee sideróforos que generalmente son formados por un compuesto quelante del hierro que la bacteria excreta y puede volver a captar (Blanco et al., 2002).

### 1.1.5 Sensibilidad a los antimicrobianos

Las cepas de *E. coli*, como las otras bacterias Gram-negativas, son intrínsecamente resistentes a los antimicrobianos hidrofóbicos, tales como macrólidos, novobiocinas, rifamicinas, actinomicina D y ácido fusídico (Scheutz y Strockbine, 2005).

Los antimicrobianos más frecuentemente empleados en el tratamiento de las infecciones por cepas de *E. coli* patógenas extraintestinales son la amoxicilina, amoxicilina - ácido clavulánico, cefalosporinas, aminoglicósidos, cotrimoxazol y quinolonas. Sin embargo, la capacidad de *E. coli* para adquirir genes de resistencia hace impredecible su sensibilidad, por lo que ésta debe determinarse siempre mediante antibiograma (Blanco et al., 2002).

Resistencia adquirida a los aminoglucósicos, betalactámicos, cloranfenicol, sulfonamidas, tetraciclinas y trimetoprim se ha descrito para cepas de *E. coli* por cuatro mecanismos distintos: alteración de diana, inactivación enzimática, menor acumulación intracelular del antimicrobiano y desvío de una etapa metabólica (Scheutz y Strockbine, 2005).

Una proporción elevada (40 a 90%) de las cepas de *E. coli* son resistentes a la ampicilina, estreptomicina, tetraciclinas y sulfamidas. También son muchas (15 a 30%) las cepas resistentes a las cefalosporinas de 1ª generación, neomicina, kanamicina, cloranfenicol y quinolonas. Entre los antibióticos que presentan menores tasas de resistencias se dispone de amoxicilina-ácido clavulánico, cefalosporinas de 2ª y 3ª generación, gentamicina, tobramicina, ampicacina, colistina y polimixina B (Blanco et al., 2002).



### 1.1.6 Prevención de las infecciones

Las ITU están entre las infecciones más comunes. Los patógenos pueden ser aislados de la vejiga (cistitis), riñones (pielonefritis), orina (bacteriuria) o próstata (prostatitis) y las cepas UPEC son los patógenos más frecuentes en estas infecciones (Smith et al., 2007; Emődy et al., 2003).

*E. coli* es la causa del 70 a 95% de las ITU, especialmente de cistitis no complicadas y de pielonefritis agudas. Los grupos de riesgo para ITU incluyen neonatos, niñas en edad pre-escolar, mujeres sexualmente activas y ancianos de ambos sexos (Bahrani-Mougeot et al., 2002). Otro importante factor de riesgo es la utilización de sondaje vesical o presencia de material inerte en el tracto urinario, puesto que esa bacteria puede adherirse a la superficie del dispositivo y crecer asociada a biopelículas lo que puede originar infecciones refractarias a la terapia antimicrobiana (Vila et al., 2008).

Tradicionalmente las estrategias terapéuticas y preventivas dependen del uso de antimicrobianos con el objetivo de inhibir el crecimiento bacteriano, pero urgen alternativas a estos compuestos debido al drástico aumento de resistencia múltiple a los antimicrobianos (Dobrindt y Hacker, 2008). Además, recientemente se ha demostrado que concentraciones subinhibitorias de antibióticos aminoglucósidos inducen a la formación de biopelícula por *Pseudomonas aeruginosa* y *E. coli* (Hoffman et al., 2007).

En ese contexto, los esfuerzos están dirigidos hacia la búsqueda de nuevos métodos que interfieran en la virulencia de las cepas de ExPEC sin provocar la pérdida de viabilidad bacteriana y la consecuente selección de

mutantes resistentes. Las alternativas más prometedoras son las que tratan de bloquear la biogénesis fimbrial, la colonización de sitios extraintestinales, la adhesión, invasión y formación de biopelícula (Dobrindt y Hacker, 2008).

## **1.2 BIOPELÍCULAS BACTERIANAS**

### **1.2.1 Definición**

Las biopelículas pueden ser definidas como comunidades de microorganismos irreversiblemente adheridas a una superficie que producen sustancia polimérica extracelular (SPE) y que exhiben un estado metabólico alterado comparadas al crecimiento planctónico correspondiente, especialmente con respecto a la transcripción y las interacciones entre las células (Lindsay y Holy, 2006).

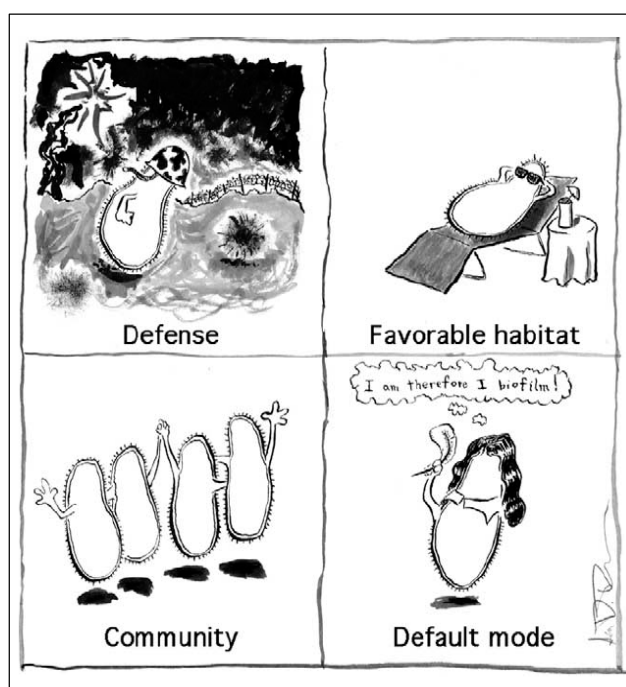
### **1.2.2 Características y propiedades**

Hay una creciente apreciación de que la formación de biopelícula contribuye a la patogenicidad de determinados microorganismos y que la persistencia de las biopelículas en el cuerpo humano sería la principal causa de la recurrencia o cronificación de diversas infecciones (Reisner et al., 2006).

Se considera que las biopelículas están implicadas en más del 80% de las infecciones crónicas causadas por bacterias, incluyendo otitis media,

endocarditis, gastritis, infecciones del tracto urinario e infecciones pulmonares en pacientes con fibrosis quística (Sauer et al., 2007).

Las biopelículas son por defecto el modo de crecimiento de la mayoría de los patógenos. Este modo de crecimiento maximiza la obtención de nutrientes favoreciendo la colonización, permite la cooperación entre las cepas por medio del crecimiento en comunidad y propicia la protección frente a los mecanismos de defensa de hospedador o a sustancias antimicrobianas. En la figura 5 están representados artísticamente esos estímulos (Jefferson, 2004).



**Figura 5.** Representación artística de las cuatro principales motivaciones para la formación de biopelículas en un proceso infeccioso (Jefferson, 2004).

El crecimiento bacteriano en superficies depende de la interacción entre varios factores de la superficie bacteriana y del sustrato, además del medio ambiente que los rodea. Generalmente las superficies son acondicionadas con

una fina película de moléculas orgánicas las cuales pueden ser atractivas a los sistemas quimiotáctiles bacterianos y permitir el desarrollo de la biopelícula (Reisner et al., 2005; Vila et al., 2008).

Tras el acondicionamiento de la superficie ocurre la deposición y adhesión reversible de las células bacterianas. Ese fenómeno ocurre pasivamente por movimiento browniano y simple sedimentación o por movimiento activo de bacterias flageladas lo que permite el establecimiento de interacciones físicas y electrostáticas entre la superficie bacteriana y el sustrato (Lindsay y Holy, 2006; Tenke et al., 2006).

Conviene resaltar que la interacción inicial entre las bacterias y superficies inertes, como material protésico, puede ocurrir tanto sobre material virgen como sobre material recubierto con macromoléculas derivadas del hospedador (Vila et al., 2008). Sin embargo, macromoléculas de los fluidos corporales se adsorben extremadamente rápido sobre los materiales implantados en el cuerpo formando la película condicionante (Gorman y Jones, 2003; Tenke et al., 2006).

La etapa siguiente consiste en la adhesión irreversible de las bacterias por producción de SPE y debido a la estimulación de proteínas receptoras de la pared bacteriana se lleva a cabo el desarrollo de puentes célula-a-célula que las unen unas a las otras, lo que estabiliza la estructura formada en un proceso denominado maduración. El siguiente período es conocido como colonización de la superficie, en él las bacterias adheridas crecen formando microcolonias que son consideradas las unidades fundamentales de una biopelícula (Lindsay y Holy, 2006).

La maduración de la biopelícula corresponde al crecimiento tridimensional y definición de una arquitectura por las interacciones entre las bacterias adheridas. Ese proceso conlleva la creación de ambientes heterogéneos desde el punto de vista fisicoquímico en el cual las bacterias asociadas a la biopelícula presentan características fisiológicas distintas de las planctónicas (Beloin et al., 2008).

Además, dependiendo de la cepa implicada, las microcolonias pueden estar compuestas de 10 – 25% de células y de 75 – 90% de matriz SPE. Las biopelículas contienen “canales de agua” que permiten el transporte de nutrientes, metabolitos y señales químicas que las células secretan en respuesta al aumento de la densidad poblacional y que interfieren en el desarrollo de la biopelícula (Tenke et al., 2006).

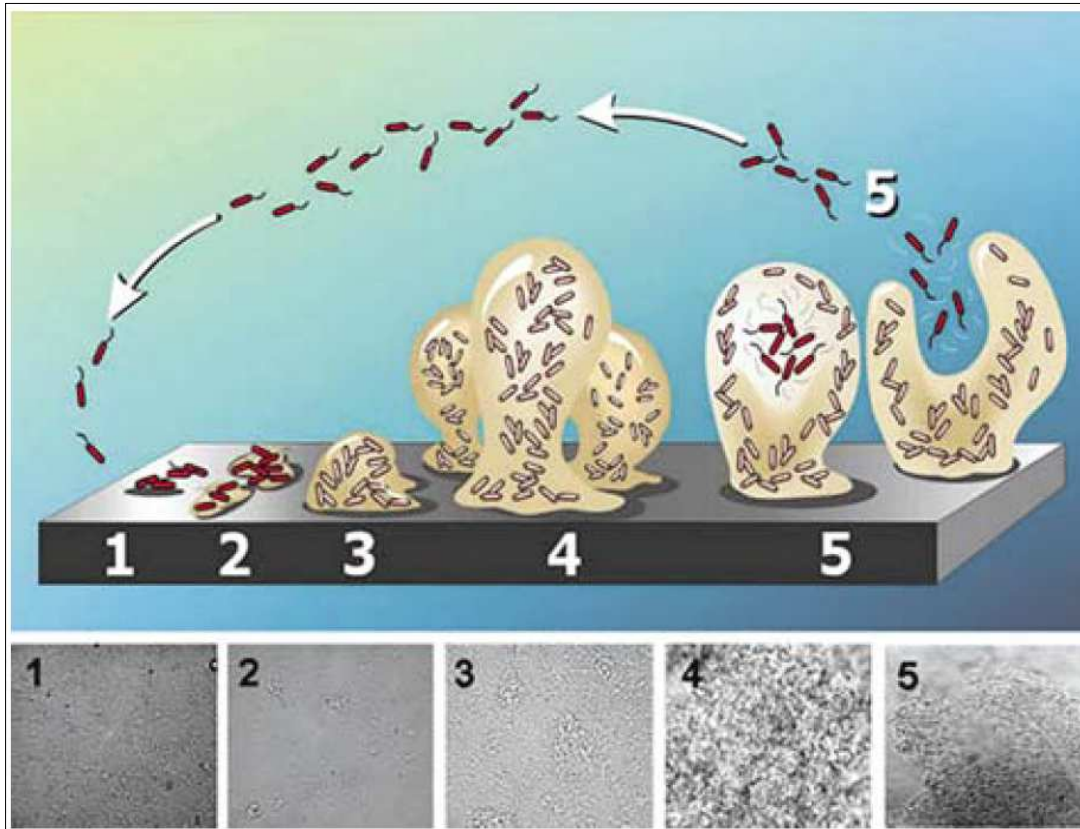
En la actualidad es bien conocido el sistema de comunicación entre las bacterias por medio de secreción de pequeñas moléculas difusibles. Varios estudios recientes indican que la formación de biopelícula es regulada por la expresión de genes dependientes de la densidad poblacional y controlados por señalización célula-a-célula en un mecanismo denominado “*quorum sensing*” (Jiang y Pace, 2006).

En un creciente número de cepas bacterianas se evidencia ese tipo de comunicación en el cual las bacterias pueden sentir cambios en el medio y coordinar la expresión genética a favor de la supervivencia de toda la comunidad. El “*quorum sensing*” regula varias funciones tan diversas como la movilidad, expresión de factores de virulencia, esporulación, producción de antibióticos, intercambio de material genético además del desarrollo de la biopelícula (Jiang y Pace, 2006; Sauer et al., 2007).

Una vez que la biopelícula ha madurado, tiene lugar la dispersión de células a otras regiones. Inicialmente se pensó que ese proceso era pasivo y dependiente de las fuerzas de arrastre del medio, pero estudios recientes sugieren que la dispersión es un proceso activo y estrictamente regulado por las células adheridas (Lindsay y Holy, 2006).

Asimismo, condiciones ambientales interfieren en la dispersión de la biopelícula entre esas se incluyen la disponibilidad de nutrientes, niveles de oxígeno, pH y presencia de determinados compuestos químicos (Goller y Romeo, 2008).

En la figura 6 están representados los principales eventos en el desarrollo de las biopelículas.



**Figura 6.** Eventos en el desarrollo de una biopelícula (Balaban et al. 2007).

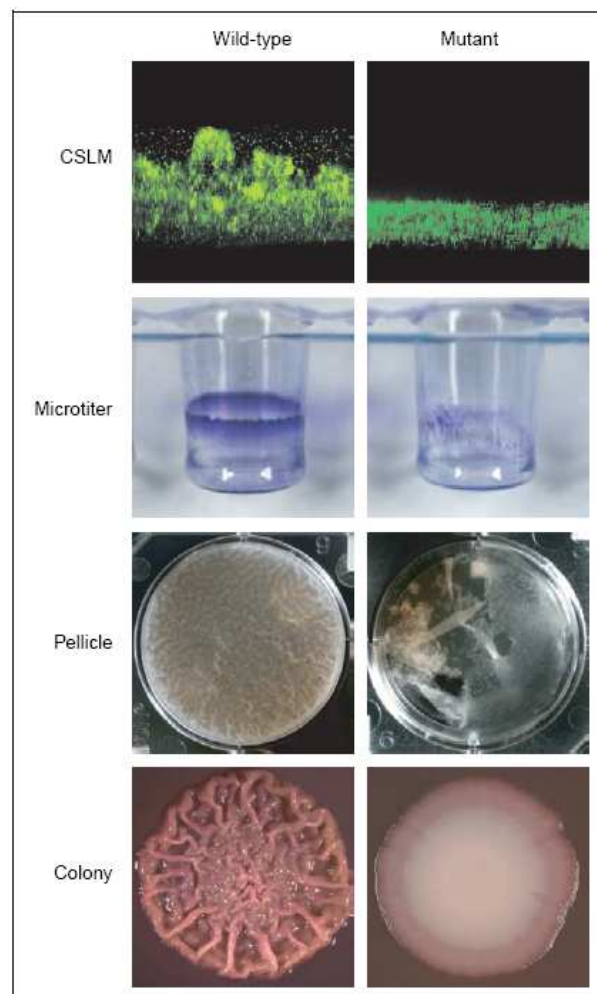
(1) Adhesión reversible (2) Adhesión irreversible y producción de SPE (3) Formación de microcolonias (4) Desarrollo de estructuras tridimensionales y maduración de la biopelícula (5) Dispersión de células.

### 1.2.3 Metodología para el estudio de las biopelículas

Hay una miríada de condiciones experimentales que favorecen la formación de biopelícula. Como consecuencia de la diversidad de técnicas y de microorganismos como objeto de estudio, además de la necesidad de reproducibilidad de los experimentos entre distintos laboratorios, cuatro sistemas generales han sido rutinariamente empleados por los investigadores:

(1) cultivos continuos asociados a visualizaciones por microscopía confocal, (2) cultivos estáticos en placas microtiter, (3) obtención de biopelículas flotantes en interfase líquido-aire y (4) visualización de la morfología de colonias en la superficie de medios sólidos (Branda et al., 2005).

En la figura 7 se compara la formación de biopelícula por cepas salvajes y mutantes defectivos por las distintas técnicas.



**Figura 7.** Comparación de la formación de biopelícula por cepas salvajes y mutantes defectivos en las distintas técnicas (Branda et al., 2005).



El aumento en el conocimiento de las biopelículas ocurre paralelamente a la implementación de nuevos métodos de estudio. Actualmente los métodos más utilizados comprenden técnicas de observación directa con la visualización microscópica de la biopelícula o técnicas de observación indirecta con método convencional de recuentos bacterianos o el uso de indicadores de metabolismo (Donlan y Costerton, 2002).

Las técnicas que se basan en la observación directa de la adherencia y colonización microbiana utilizan microscopios ópticos, confocales o electrónicos. Los primeros consisten en la opción más antigua y asequible para estudio de las biopelículas, además es considerada una de las más versátiles pese que presente limitaciones como la necesidad de tinción y/o fijación de las muestras y consecuente muerte de los microorganismos, producción de artefactos y imposibilidad de estudiar la estructura tridimensional de la biopelícula (Christensen et al., 2000).

La microscopía confocal suprime varias de las limitaciones de la microscopía óptica. Los microscopios confocales combinan la iluminación láser, las imágenes confocales, el uso de objetivos apocromáticos y el procesamiento de las imágenes por ordenador que genera reconstrucciones tridimensionales del espécimen visualizado. De esta manera se puede estudiar la arquitectura de la biopelícula, las interacciones entre las bacterias y la superficie y con el uso combinado de determinados marcadores se evidencia y se cuantifica el contenido de células viables o componentes de la matriz celular *in situ* (Christensen et al., 2000).

Los microscopios electrónicos pueden ser de transmisión y de barrido, en ambos se necesita la preparación previa de las muestras lo que habitualmente genera artefactos o distorsiones en la estructura normal de una biopelícula, aparte de destruir los microorganismos y no proporcionan informaciones sobre la viabilidad celular. Aunque presenta dichas limitaciones, el microscopio electrónico de barrido permite la cuantificación de microorganismos adheridos a superficies opacas como plásticos, metales, cerámicas o catéteres diversos lo que sería imposible por los otros métodos (Christensen et al., 2000).

Los métodos indirectos permiten la cuantificación de microorganismos adheridos a superficies por su retirada en etapas abrasivas con rascados, agitación o sonicación de los materiales y posterior dilución y recuentos bacterianos. Las principales limitaciones residen en el hecho de que esas técnicas no permiten el análisis de la estructura de la biopelícula, las etapas abrasivas podrían resultar en injurias y disminución del número de células viables además de que no todos microorganismos de la biopelícula son cultivables (Lindsay y Holy, 2006).

La utilización de tinciones y de indicadores metabólicos se presenta como alternativa viable para el estudio y cuantificación de la formación biopelículas por diversos microorganismos (Christensen et al., 2000). Estos ensayos son ejecutados en placas microtiter para determinar tanto la biomasa total (matriz, células vivas y muertas), componentes específicos de la matriz por su tinción, o para la cuantificación de viabilidad (Peeters et al., 2008).

Los ensayos para cuantificación de formación de biopelícula en placas microtiter son empleados para diversos microorganismos. Un particular

enfoque ha sido dado al uso del cristal violeta como indicador de biomasa total para distinguir entre cepas parentales de *E. coli* y mutantes con adhesión alterada, y también para clasificar en categorías de formación de biopelículas cepas de *Staphylococcus epidermidis* y *Vibrio spp.* (Pitts et al., 2003).

Los ensayos que miden la biomasa total tienen limitaciones en los estudios de disrupción de biopelículas una vez que no permiten la diferenciación entre células viables y muertas lo que dificulta la evaluación de la acción de antimicrobianos contra las bacterias asociadas a biopelícula. Para la discriminación entre células viables y muertas se emplean técnicas que cuantifican la actividad metabólica con tinciones vitales como las sales de tetrazolio, diacetato de fluoresceína y resazurina o azul de alamar (Peeters et al., 2008).

El uso del azul de alamar fue descrito por Drummond y Waigh en 2000 y desde entonces viene siendo modificado con el objetivo de mejorar su precisión y aplicabilidad en la determinación de la CMI de diversos compuestos (Sarker et al., 2007). Ese método permite determinar la viabilidad en sistemas de cultivo planctónico o sésil, no simplemente la biomasa, además es un método fiable, reproducible y que tiene una excelente correlación con la determinación de los recuentos bacterianos. Las principales limitaciones del método son la sensibilidad del colorante-vital a la luz y al calor, condiciones que son fácilmente controlables en el laboratorio (Pettit et al., 2005).

#### 1.2.4 Biopelículas en *E. coli*. Patogenicidad y virulencia

Las cepas UPEC poseen un arsenal de factores de virulencia que contribuyen activamente en su habilidad de causar infecciones en el tracto urinario humano. Se conoce que varios factores contribuyen a la formación de biopelículas por las cepas de *E. coli* como fimbrias, curli, flagelos, antígeno 43 y moléculas de la matriz extracelular incluyendo celulosa, ácido colánico y poli- $\beta$ -1,6-*N*-acetil-D-glucosamina (Jacobsen et al., 2008).

La producción de varios determinantes en la superficie celular desempeña un papel crítico en la virulencia de un patógeno. La interacción entre bacterias y una determinada superficie es mediada por una red compleja de interacciones químicas y físicas afectadas por las condiciones ambientales, por la superficie en la cual se fijan, además de propiedades inherentes a la propia superficie bacteriana (Van Houdt y Michiels, 2005; Palmer et al., 2007).

La adhesión bacteriana es considerada una etapa fundamental de los procesos infecciosos en el tracto urinario, una vez que allí el microorganismo es sometido al flujo urinario y a la posibilidad de ser arrastrado y eliminado. Las cepas de *E. coli* son responsables de más de 80% de todas ITU por lo que los mecanismos que garantizan la adherencia y colonización de este sitio anatómico son considerados como primordiales en la virulencia de cepas UPEC (Van Houdt y Michiels, 2005; Hancock et al., 2007).

El crecimiento como bacterias asociadas a biopelícula permite también una mayor resistencia a la respuesta inmune y dificulta la acción de antimicrobianos contra el patógeno. Actualmente se asocia la capacidad de formación de biopelículas a la cronificación de las infecciones bacterianas tales

como prostatitis crónica que son de difícil erradicación por terapia antimicrobiana convencional (Kanamaru et al., 2006; Soto et al., 2007)

Las adhesinas fimbriales primarias de las cepas UPEC son las fimbrias tipo 1, las fimbrias P y las fimbrias F1C y por lo general esas cepas están bien equipadas de adhesinas y la mayoría expresan tres o más tipos diferentes de fimbrias (Hancock et al., 2006).

Las fimbrias curli son otras importantes adhesinas presentes en más del 50% de las cepas UPEC que además de mediar adhesión en superficies abióticas confieren habilidades a las cepas como autoagregación, anclaje a laminina, fibronectina, plasminógeno, a varios tipos de colágeno y otros receptores encontrados en los epitelios del tracto urinario. La expresión de las fimbrias curli en cepas UPEC es en la mayoría de los casos termoregulada, maximizada a la temperatura alrededor de 30°C por lo que se postula que éste tipo de fimbria estaría implicada en la colonización primaria de superficies corporales externas como la región perineal y el orificio del tracto urinario (Pátri et al., 2000).

Como factor de virulencia relacionado a la formación de biopelícula los flagelos permiten la fijación de la bacteria a las células epiteliales y facilitan las etapas iniciales de adherencia a materiales abióticos (Lindsay y von Holy, 2006). Muchos estudios han implicado la presencia de flagelos, la movilidad y la quimiotaxis con la formación de biopelículas, aunque el papel de la movilidad en la patogénesis permanezca incierto (Hatt y Rather, 2008).

El antígeno 43 es una prominente proteína de la superficie de *E. coli* (aproximadamente 50.000 copias por célula) la cual contiene ambos receptor y

diana de reconocimiento por lo que es una adhesina capaz de auto-reconocerse. Su expresión posibilita la agregación entre las células aunque se ha comprobado que la formación de biopelícula ocurre de manera independiente en cepas capsuladas y que la presencia de las fimbrias tipo 1 inhibe la autoagregación debida a esa proteína (Van Houdt and Michiels, 2005).

Una de las propiedades más características que distingue las biopelículas del crecimiento planctónico es la existencia de la matriz extracelular embebiendo las bacterias asociadas y definiendo la arquitectura de una biopelícula madura. Pese a que la matriz extracelular sea una de las más emblemáticas características de una biopelícula, su papel aún no es totalmente comprendido (Dunne Jr., 2002; Beloin et al., 2008). Algunos autores definen que la función primaria de la matriz extracelular sería la protección de la biopelícula de la acción de agentes antimicrobianos por su neutralización química o por la creación de una barrera de difusión que impide que las células sean alcanzadas (Lindsay y von Holy, 2006).

La matriz constituye un complejo ambiente esencialmente compuesto en un 97% de agua, pero que tiene polímeros extracelulares, polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos / fosfolípidos, nutrientes absorbidos y metabolitos. Hasta la fecha, los tres polisacáridos detectados en la matriz de biopelículas de *E. coli* que se han demostrado como significativos en su formación son la celulosa, el ácido colánico y la poli- $\beta$ -1,6-*N*-acetil-D-glucosamina. Esos polisacáridos ejecutan funciones de aumento de la adhesión célula-a-célula y a superficies, además de estabilizar la estructura de la biopelícula (Beloin et al., 2008).

### **1.2.5 Papel de las biopelículas de *E. coli* en infecciones humanas**

La capacidad de formar biopelícula es un proceso que contribuye a la patogenicidad de diversos microorganismos. Se ha propuesto una serie de criterios que harían suponer que biopelículas podrían estar relacionadas a un determinado proceso infeccioso, entre ellos figuran el aislamiento de microorganismos con capacidad adherente entre si y/o a superficies, la observación de bacterias agrupadas en muestras *in vivo*, además de que la infección presenta un patrón localizado y no responde a antimicrobianos activos *in vitro* (Reisner et al., 2006).

Las características de las biopelículas que impactan en los procesos infecciosos incluyen (a) desprendimiento de células o agregados de la biopelícula que pueden resultar en infecciones en la corriente sanguínea, en el tracto urinario o en formación de émbolos (b) aumento del intercambio de elementos genéticos que confieren resistencia dentro de la biopelícula (c) bacterias asociadas a biopelículas exhiben una gran reducción de susceptibilidad a los antimicrobianos (d) bacterias Gram negativas asociadas a biopelículas pueden producir endotoxinas (e) las biopelículas son resistentes a la eliminación por el sistema inmunitario del hospedador (Donlan, 2002).

Las ITU son especialmente frecuentes en pacientes con catéteres urinarios. El período medio del sondaje es de 2 a 4 días y del 15 al 30% de los pacientes adquieren ITU. Debido a la capacidad de formación de biopelícula en estos dispositivos, la incidencia de infecciones aumenta en un ritmo de 5 a 10%

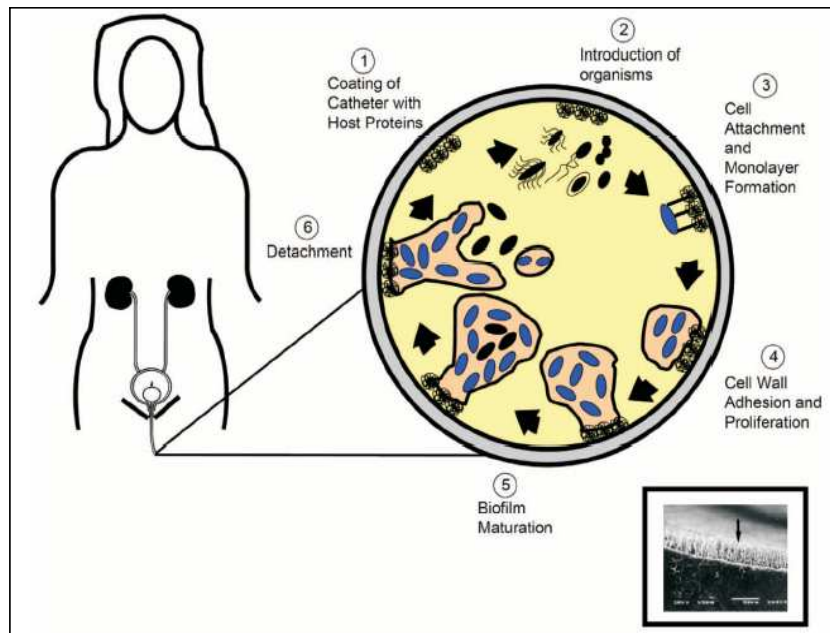
al día de manera que dentro de 3 semanas de uso, la totalidad de los pacientes sondados desarrollará infecciones (Jubelin et al., 2006).

Alrededor de 100 millones de catéteres urinarios son vendidos anualmente en todo el mundo. Son unos de los dispositivos más utilizados en la práctica médica y su función básica es mantener el flujo urinario. En parte debido a la frecuencia del sondaje (entre el 21 a 50% de pacientes), a veces innecesario durante la hospitalización, las ITU asociadas al uso de catéteres son consideradas las infecciones nosocomiales más comunes (Jacobsen et al., 2008).

La inserción de un cuerpo extraño como un catéter en la vejiga aumenta la susceptibilidad del paciente a las ITU tanto por la introducción de microorganismos oportunistas, como por traumatismos y lesiones del epitelio o por la propia presencia de material exógeno en el tracto urinario (Donlan, 2002; Trautner et al., 2004; Jacobsen et al., 2008).

En la figura 8 se representa la patogénesis de la formación de biopelícula en un catéter urinario durante una ITU asociada al catéter.



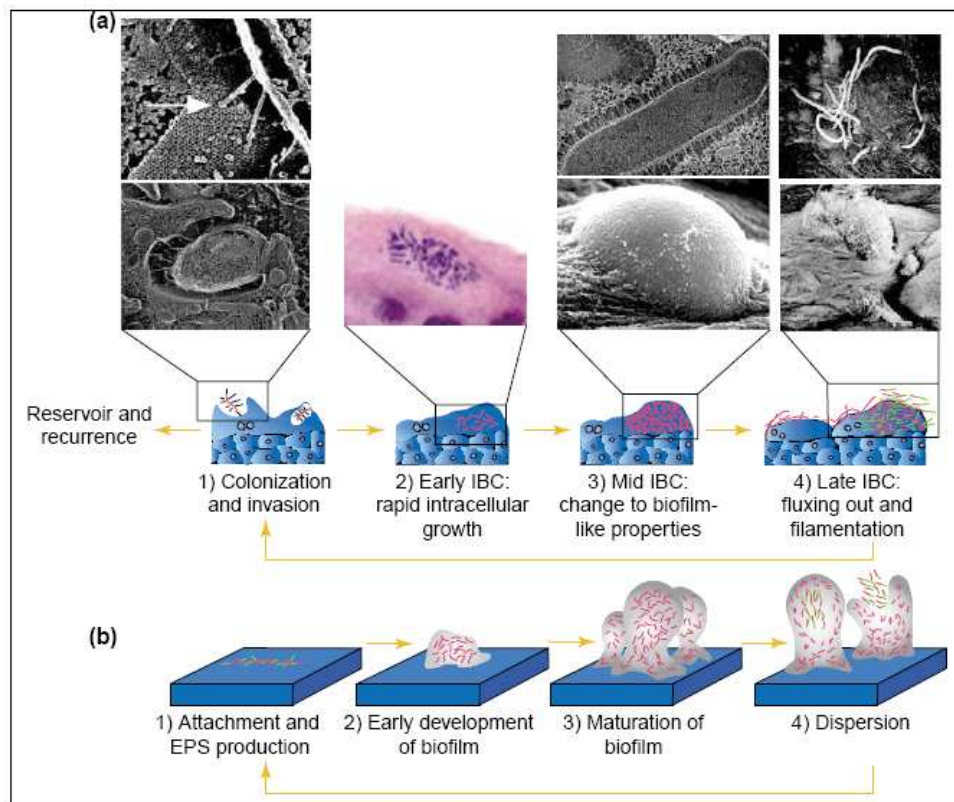


**Figura 8.** Patogénesis de la formación de biopelícula en un catéter urinario durante una ITU asociada al catéter (Jacobsen et al., 2008).

(1) Recubrimiento del dispositivo con proteínas del hospedador; (2) seguido de la introducción de microorganismos procedentes de la propia microbiota del paciente o del ambiente del hospital; (3 – 6) a continuación se da lugar el proceso de adherencia bacteriana con el consiguiente establecimiento y desarrollo de la biopelícula.

En el modelo murino de cistitis las cepas UPEC invaden las células epiteliales y activan una compleja cascada genética lo que resulta en la formación de comunidades bacterianas intracelulares (CBI). Durante la maduración de las CBI las bacterias presentan cuatro etapas distintas de desarrollo que son diferentes con respecto a la tasa de crecimiento, al tamaño bacteriano, organización de la colonia, movilidad y dispersión (Kau et al., 2005).

En la figura 9 se ilustra el crecimiento y maduración de las cepas UPEC en las CBI durante las cistitis y las semejanzas que ese proceso tiene con la formación de biopelícula.



**Figura 9.** Esquema del desarrollo de la cascada patogénica de las cepas UPEC. (Kau et al., 2005)

**(a)** Etapas en la formación y maduración de las CBI:

(1) Colonización e invasión, interacción de las fimbrias tipo 1 con las células del epitelio (panel superior) e inducción de fagocitosis de las cepas UPEC (panel inferior); (2) Formación inicial de la CBI, evidenciado por tinción del epitelio con hematoxilina/eosina; (3) Desarrollo de la CBI, las cepas UPEC producen matriz

extracelular (panel superior) y se comportan como bacterias asociadas a biopelícula. Formación de protusión luminal en el epitelio parasitado (panel inferior); (4) Etapa tardía de la CBI, caracterizada por la filamentación (panel superior) y erupción de la CBI (panel inferior).

**(b)** Representación esquemática en paralelo de las etapas de formación de biopelícula en la superficie de material abiótico:

(1) Adhesión y producción de la SPE; (2) Inicio de la formación de la biopelícula; (3) Saturación de la biopelícula y (4) Dispersión.

Como se observa en la figura 9 muchas de las características fenotípicas de las bacterias asociadas a biopelícula son expresadas por las cepas UPEC durante la formación de las CBI en infecciones del tracto urinario (Kau et al., 2005).

Las UTI exhiben un grado de recurrencia de más del 25% en seis meses, y más del 68% de las infecciones recurrentes son causadas por cepas idénticas a las que causaron la infección inicial en un período anterior de más de un año (Mysorekar y Hultgren, 2006).

Así, la formación de estructuras altamente organizadas como las biopelículas y las CBI puede ser considerada como estrategias de replicación y de persistencia de las cepas UPEC en el tracto urinario.

### 1.3 ESTRATEGIAS DE LUCHA FRENTE A BIOPELÍCULAS

En la actualidad se considera la capacidad de persistencia de las bacterias asociadas a biopelículas en un hospedador humano o en el ambiente, pese la presión de tratamientos antimicrobianos, como una observación fundamental que traspasa todo los campos de la microbiología y que refuerza la necesidad de alteraciones radicales en el control y tratamiento de las infecciones crónicas relacionadas a biopelículas (Gorman y Jones, 2003; Cegelski et al., 2008).

El notorio impacto de las biopelículas en el ámbito médico acarrea al aumento de las investigaciones de la biología y mecanismos reguladores de su formación y dispersión (Jefferson, 2004; Prüss et al., 2006). Hoy día, se han propuesto varias estrategias con el objetivo de inhibir la formación de biopelículas por diferentes sustancias tanto en solución como aplicadas a dispositivos médicos (An y Friedman, 1998; Katsikogianni y Missirlis, 2004; Cerca et al., 2005).

Se han desarrollado varios procedimientos con el objetivo de prevenir la formación de biopelícula o de erradicar biopelículas preformadas. Entre ellos se incluyen la prevención de la adherencia inicial de la bacteria a superficies abióticas, bióticas, o a otras bacterias, interrupción de los mecanismos de *quorum sensing* que son necesarios para la expresión genética de componentes de la biopelícula, inhibición de la biosíntesis de polisacáridos y proteínas de la matriz de la biopelícula y la búsqueda y perfeccionamiento de enzimas que puedan degradar la matriz y permitir el acceso de los

antimicrobianos convencionales y de los mecanismos de defensa del propio hospedador (Cegelski et al., 2008).

La actuación sobre los mecanismos de virulencia es otro procedimiento potencial de las nuevas terapias. Estas estrategias buscan interferir con mecanismos específicos que promuevan la infección o que sean esenciales para la persistencia, tales como la unión a receptores celulares, invasión, señalización química y formación de biopelícula (Brown et al., 2008; Cegelski et al., 2008).

### **1.3.1 Inhibición de formación de biopelículas**

La prevención de formación de biopelículas en los dispositivos médicos es buscada a través de la utilización de agentes antimicrobianos bactericidas o bacteriostáticos o aún con el empleo de agentes desprovistos de acción antimicrobiana pero que interfieran o inhiban la adhesión bacteriana (Danese, 2002; Dunne Jr, 2002).

Forman parte de las estrategias que dificultan la formación de biopelículas, la fabricación de materiales con compuestos incorporados como por ejemplo iones de plata, agentes antimicrobianos clásicos que son liberados de manera prolongada, el desarrollo materiales con superficies alteradas (hidrofobicidad) y también de tratamientos antiadhesivos con el recubrimiento por moléculas como heparina, proteínas o biosurfactantes que perturben las fuerzas físico-químicas necesarias para la adhesión inicial (Danese, 2002; Lindsay y von Holy, 2006).

La combinación de agentes físicos y químicos en el control de formación de biopelícula es cada vez más contemplada una vez que aun no se conoce un método o compuesto único que sea capaz de hacerlo de manera efectiva. Se han descrito métodos que asocian distintos agentes antimicrobianos entre si, protocolos que los combinan con ultrasonido de baja frecuencia y fuerza, y otros con corrientes eléctricas (Jiang y Pace, 2006).

El revestimiento de catéteres urinarios con cepas avirulentas de *E. coli* fue estudiado en 12 pacientes voluntarios que necesitaban de catéter de drenaje (transuretral o suprapúbico). En este estudio se observó la colonización por esta cepa en 10 pacientes durante 14 o más días y que la frecuencia de ITU sintomática fue de 0,15 casos por 100 días-paciente, siendo la frecuencia de 2,72 en condiciones habituales (Trautner et al., 2007).

Una nueva estrategia que podría ser utilizada para la inhibición de formación de biopelícula por *E. coli* es el revestimiento de catéteres urinarios con polisacáridos capsulares del grupo II, una vez que se ha demostrado su capacidad para reducir la adhesión y formación de biopelículas (Dobrindt y Hacker, 2008).

### **1.3.2 Antimicrobianos frente a microorganismos asociados a biopelículas**

Muchas de las infecciones crónicas son resultado de la formación de biopelículas por bacterias patógenas que están implicadas en infecciones como endocarditis, otitis media, infección pulmonar en pacientes con fibrosis quística, infecciones urinarias, formación de placa dentaria, gingivitis e infecciones relacionadas a catéteres que son particularmente difíciles de tratar con

antimicrobianos (Marra, 2006).

Lo que mejor distingue las infecciones crónicas relacionadas con biopelículas de las infecciones agudas es su respuesta a la terapia antimicrobiana. Las infecciones por biopelículas no suelen erradicarse completamente, pueden producir episodios recurrentes y además cuando se asocian a dispositivos médicos necesitan de regímenes terapéuticos más drásticos e incluso la sustitución de los mismos (Uzcudun, 2004).

Las características estructurales y fisiológicas de las biopelículas confieren una resistencia innata tanto a antibióticos como a desinfectantes y a germicidas. Las bacterias asociadas a biopelículas pueden resistir a los agentes antimicrobianos por mecanismos adicionales diferentes a los de las bacterias planctónicas (Rodríguez-Martínez y Pascual, 2008).

La susceptibilidad a los agentes antimicrobianos es menor en bacterias asociadas a biopelículas que en sus correspondientes planctónicas (Olson et al., 2002; Parsek y Fuqua, 2004; Sepandj et al., 2004; Caraher et al., 2006; Chambers et al., 2006; Sandoe et al., 2006; Aslam 2008). Esa resistencia dificulta la erradicación de los patógenos por antimicrobianos aunque estos fuesen activos en los ensayos *in vitro* (Dolan y Costerton, 2002; Chambers et al., 2006; Frank et al., 2007).

Estudios *in vivo* demostraron que el tratamiento de endocarditis inducidas por biopelículas de *E. coli* en conejos, necesitaron concentraciones del antimicrobiano 220 veces mayores que la menor concentración sérica bactericida para las bacterias planctónicas de la misma cepa (Hall-Stoodley et al., 2004).

Los mecanismos de resistencia de bacterias asociadas a biopelícula son complejos y pueden ser resultantes de propiedades intrínsecas a las propias biopelículas, o que las células expresen distintos fenotipos o genotipos (Costerton et al., 1999; Lindsay y von Holy, 2006). Además, bacterias embebidas en una biopelícula entran en un estado estacionario donde se dispara la producción de la SPE lo que ocasiona una reducción de la difusión moléculas activas y una consecuente pérdida de susceptibilidad a los antimicrobianos (Gualtieri et al., 2006).

En la mayoría de los casos el tratamiento antimicrobiano reduce la progresión de la biopelícula por eliminación de las células planctónicas e interferencia en el metabolismo de las bacterias asociadas a biopelícula. Sin embargo, la biopelícula y por tanto la infección no son totalmente eliminadas de manera que nuevas estrategias para el control de las biopelículas han sido propuestas (Marchese et al., 2003; Lindsay y von Holy, 2006).

Desde el punto de vista de la práctica clínica se disponen de cuatro estrategias en la intervención de las infecciones relacionadas a las biopelículas. La primera consiste en la prevención de la contaminación inicial del dispositivo con el empleo de técnicas asépticas y minimización del tiempo de inserción del catéter. La segunda es el uso de materiales o de revestimientos que disminuyan la adhesión bacteriana, como por ejemplo el uso de catéteres venosos recubiertos por antimicrobianos. Una vez establecida la infección, la tercera estrategia de control sería el uso de antimicrobianos capaces de penetrar en la matriz y destruir los microorganismos embebidos y la cuarta sería la retirada del dispositivo contaminado (Trautner et al., 2004; Aslam, 2008).





## 2. OBJETIVOS

1. Evaluar diferentes métodos de estudio de la capacidad de formación de biopelículas por cepas patógenas de *E. coli* sobre placas de poliestireno.
2. Correlacionar la capacidad de formación de biopelícula y factores de virulencia detectados en las cepas patógenas de *E. coli*.
3. Estudiar los efectos de diferentes compuestos en la formación de biopelícula por *E. coli*.
4. Comparar la actividad de antimicrobianos sobre cepas patógenas de *E. coli* planctónicas y asociadas a biopelícula.



### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **3.1 MICROORGANISMOS**

En este estudio se emplearon 14 cepas patógenas de *E. coli* aisladas de pacientes con diferentes condiciones clínicas: siete (50%) con pielonefritis aguda (incluido un paciente con bacteriemia concomitante), cuatro (28,6%) con bacteriuria asintomática, dos (14,3%) con herida infectada y una (7,1%) de cistitis. Además de estas cepas, se incluyó *E. coli* ATCC 25922 en todos los ensayos.

#### **3.2 SEROTIPADO**

La presencia de los antígenos O y H fue determinada por aglutinación con los antisueros disponibles (O1 – O185 y H1 – H56) utilizando el método descrito por Blanco et al., 1996. Todos los sueros se adsorbieron con sus correspondientes antígenos de reacción cruzada con el objetivo de retirar posibles aglutininas no específicas. Los antisueros O fueron producidos en el

Laboratorio de Referencia de *E. coli* (Lugo, España) y los antisueros H fueron obtenidos del *Statens Serum Institute* (Copenhague, Dinamarca).

Se efectuó la determinación de los antígenos O por aglutinación con los antisueros en placas microtiter de 96 pocillos con fondo en V en los cuales fueron añadidos 50 µL de antisuero diluido (1/40 o 1/80) y 50 µL de la suspensión bacteriana ( $1,8 \times 10^9$  ufc/mL) previamente calentada a 100°C durante 1 hora. La técnica se realizó en tres etapas. Cuando se obtenía una reacción positiva con uno o más de los antisueros polivalentes (primer paso), la suspensión bacteriana era ensayada con cada uno de los antisueros incluidos en el antisuero polivalente correspondiente (segundo paso). Si se producía una aglutinación con uno o más antisueros O monovalentes, se procedía a la titulación confirmatoria (tercer paso).

Para la determinación del antígeno H, las cepas fueron sembradas en medio semisólido con tres pases consecutivos para potenciar la expresión de los flagelos, a las cepas que se comportaban como inmóviles les fueron dados tres nuevos pases y, si continuaron siendo inmóviles, se consideraron como H-. Las cepas móviles se incubaron en 7 mL de caldo infusión corazón-cerebro (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, Francia) durante 8 horas a 35,5°C, a continuación se añadió 7 mL de solución salina formolizada y se dejó el tubo a temperatura ambiente una noche. Luego se transfirieron alícuotas de 0,5 mL de la suspensión bacteriana formolizada a tubos de vidrios, se les agregó el mismo volumen de antisuero H monovalente diluido al 1/200 y se incubó en un baño de agua a 45°C durante 2 horas. La aglutinación se consideró positiva cuando se formó una película en el fondo del tubo y el sobrenadante resultó transparente.

### **3.3 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE FACTORES DE VIRULENCIA DE LA SUPERFICIE BACTERIANA**

La expresión fenotípica de factores de virulencia asociados a la superficie bacteriana fue estudiada por medio de distintas técnicas descritas a continuación.

Las pruebas de hemaglutinación y detección de fimbrias P fueron realizadas siguiendo el método descrito por Blanco et al., 1990. La hemaglutinación fue estudiada utilizando tanto eritrocitos humanos del grupo A, como de ternera, conejillo de indias, pollo, carnero y cerdo en placas de Petri. A una gota de suspensión bacteriana ( $10^{12}$  ufc/mL en PBS, pH 7,4) obtenida a partir de un cultivo en agar CFA (*Colonization Factor Antigen*) se le añadió una gota de suspensión de cada clase de eritrocitos al 3% en PBS y a otra gota de suspensión bacteriana, además de la gota de suspensión con los eritrocitos se le añadió otra con D-manosa al 3% (Sigma, St. Louis, EEUU). Las placas se agitaron durante cinco minutos a temperatura ambiente y seguidamente se incubaron a 4°C otros cinco minutos.

La hemaglutinación fue considerada resistente a manosa (MRHA) cuando la reacción ocurrió en su presencia, o como sensible (MSHA) cuando fue inhibida por ese hidrato de carbono. Las cepas fueron agrupadas de acuerdo con su patrón de MRHA en seis tipos (I - VI). MSHA es el resultado de

la expresión fenotípica de las fimbrias tipo 1, mientras MRHA de fimbrias P, S u otras adhesinas.

La detección de las fimbrias P se llevó a cabo empleando el *PF test* (Orion Diagnostica, Espoo, Finlandia) por aglutinación de partículas de látex recubiertas con el receptor de las fimbrias P. Para realizar esta prueba se utilizó una gota de la misma suspensión bacteriana preparada para los ensayos de hemaglutinación y se emplearon como control partículas de látex sin este receptor.

La expresión de las fimbrias tipo curli fue evaluada con la siembra de las cepas en agar Luria-Bertani modificado conteniendo 0,004% de rojo Congo y 0,002% de azul G brillante de Coomassie (Sigma) seguida de incubación a 30°C durante 24 horas. Las colonias con pigmentación roja o rosa fueron identificadas como productoras de curli mientras que las blancas como negativas (Vianney et al., 2005).

### **3.4 DETECCIÓN DE GENES DE VIRULENCIA**

Las 15 cepas fueron analizadas en el Laboratorio de Referencia de *E. coli* (Lugo, España) empleándose cebadores específicos para algunos de los genes que codifican factores de virulencia característicos de las cepas de *E. coli* patógenas extraintestinales. (Johnson y Stell, 2000; Blanco et al., 1997a; Blanco et al., 1997b; Yang et al., 2004; Moulin-Schouleur et al., 2006; Nicolas-Chanoine et al., 2007; Ullet et al., 2007; Ong et al., 2008). En resumen, se

preparó un volumen de 250 µL de suspensión bacteriana en agua bidestilada estéril en un tubo eppendorf, se calentó a 100°C durante 5 minutos y luego fue centrifugada a 10.000rpm / 5min, se tomaron 7 µL de la suspensión conteniendo el ADN y se preparó la mezcla de reacción con 23 µL de agua bidestilada estéril conteniendo 60 a 150 ng de los cebadores, los cuatro nucleótidos a una concentración final de 0,2 mM cada uno de ellos, Tris HCl 10 mM (pH 8,8), MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, KCl 50 mM y una unidad de polimerasa (BIOTAQ™ DNA polymerase, BIOLINE, Reino Unido). Al volumen final se añadieron otros 30 µL de aceite mineral para evitar evaporaciones.

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (PCR Express, Hybaid, EEUU) siendo sometida la mezcla de reacción a un ciclo de desnaturalización (94°C / 2 min.), 35 ciclos de desnaturalización-acoplamiento-polimerización (94°C / 1 min., 55°C / 1 min., 72°C / 1 min.) y un ciclo final de polimerización (72°C / 2 min.). Los productos amplificados en la prueba de PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa (Seakem LE agarose, BMA, EEUU) al 2% en la solución amortiguadora Tris-Borato-EDTA (TBE).

Previamente a la electroforesis, se añadió tampón a 1/5 del volumen a la muestra a cargar en el gel (habitualmente 10 a 12 µL). Como marcador de pesos moleculares se usó el ADN del bacteriófago øX174 cortado con *HaeIII* (fragmentos de 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118 y 72 pares de bases) (Promega, EEUU). La electroforesis se realizó con fuente y cubetas de electroforesis de Bio-Rad. El voltaje aplicado a los geles fue de 130 V durante 20 a 40 minutos, dependiendo del tamaño del gel. Los geles de agarosa se tiñeron



en un baño con bromuro de etidio (10 mg/L) (Merck) y se observaron bajo luz ultravioleta (transiluminador modelo 2010 Macrovue, LKB).

En la tabla 2 se muestran los 30 genes de virulencia estudiados, entre ellos se incluyeron 15 que codifican adhesinas, cuatro toxinas, cuatro sideróforos, cinco protectinas / invasinas, el marcador de isla de patogenicidad *malX* y *cvaC* que codifica para colicina V.

**Tabla 2.** Genes de virulencia estudiados en las 15 cepas de *E. coli*

| Genes de virulencia  | Descripción   |
|--|---|
| <b>Adhesinas</b>   |   |
| <i>papC</i> y alelos <i>papGI</i> , <i>GII</i> y <i>GIII</i> | pilis asociados a pielonefritis   |
| <i>sfa/focDE</i> y <i>focG</i>                               | fimbrias S y F1C  |
| <i>afa/draBC</i>   | adhesinas Dr-binding afimbriales  |
| <i>iha</i>   | adhesina receptora de sideróforo  |
| <i>bmaE</i>  | fimbria M   |
| <i>gafD</i>  | fimbria G   |
| <i>nfaE</i>  | adhesina no fimbrial tipo 1   |
| <i>fimH</i>  | fimbria tipo 1  |
| <i>fimA</i> vMT78  | fimbria tipo 1 variante de la cepa <i>E. coli</i> MT78 patógena de aves |
| <i>agn43</i>   | antígeno 43   |
| <i>cluster c1931-c1936</i>                                   | fimbria F9  |
| <i>cluster mrkABCDF</i>                                      | fimbria tipo 3  |
| <b>Toxinas</b>   |   |
| <i>hlyA</i>  | alfa-hemolisina   |
| <i>cnf1</i>  | factor citotóxico necrotizante  |
| <i>sat</i>   | toxina auto-transportadora secretada                                    |
| <i>tsh</i>   | hemaglutinina sensible a la temperatura                                 |
| <b>Sideróforos</b>   |   |
| <i>iroN</i>  | receptor sideróforo   |
| <i>fyuA</i>  | receptor yersiniabactina  |
| <i>iutA</i>  | receptor aerobactina  |
| <i>iucD</i>  | aerobactina captadora de hierro   |
| <b>Protectinas / invasinas</b>                               |   |
| <i>kpsM</i> II y <i>kpsMT</i> III                            | síntesis de cápsula de los grupos 2 y 3                                 |
| <i>neuC</i>  | variante <i>kps</i> del antígeno K1                                     |
| <i>traT</i>  | resistencia sérica  |
| <i>ibeA</i>  | invasión de células del endotelio microvascular cerebral                |
| <b>Otros</b>   |   |
| <i>malX</i>  | marcador de isla de patogenicidad                                       |
| <i>cvaC</i>  | colicina V  |

### **3.5 MÉTODOS PARA EL ESTUDIO DE FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA**

#### **3.5.1 Estudios preliminares**

La capacidad de formación de biopelícula por cuatro cepas (Ec1, Ec2, Ec3 y EcATCC) fue evaluada con la metodología propuesta por Danese et al. 1990, pero incluyendo algunas modificaciones. Se estudió la interferencia de variables como el tipo de caldo de cultivo, la utilización de protocolos con una o dos etapas de incubación y la aplicación de tres fórmulas matemáticas distintas en la cuantificación de la biopelícula.

Se estudió la formación de biopelículas en cuatro caldos de cultivo distintos siendo dos de ellos medios mínimos suplementados con 8 g/L de glucosa (Sigma): caldo M63 (US Biological, Swampscott, EEUU) y M9 (Sigma), y los otros dos medios enriquecidos: caldo Luria-Bertani (LB) con 5 g/L de glucosa y caldo Mueller-Hinton II (MH-II, Becton Dickinson).

Inicialmente, las cepas se sembraron en caldo triptosa soja (BioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia), se incubaron a 35,5°C durante 4 horas, se alicuotaron y se conservaron a -20°C. En el momento de llevar a cabo los estudios de formación de biopelícula las bacterias se descongelaron y se sembraron en placas de agar triptosa soja con 5% de sangre de cordero (TSS, BioMérieux) a 35,5°C durante 24 horas. Posteriormente, de los cultivos crecidos se inocularon cinco colonias en tubos con 5 mL de caldo LB que fueron incubados a 35,5°C durante 24 horas. A continuación se sembraron alícuotas de 1,3 µL de los

cultivos en 130  $\mu$ L de los caldos M63, M9, LB y MH-II (aproximadamente  $10^5$  ufc) en pocillos de placas microtiter de poliestireno no tratadas para cultivo celular y con fondo plano (Greiner Bio-one, Stuttgart, Alemania) que se incubaron en condiciones estáticas a 30°C durante 24 horas. Se utilizaron pocillos con los distintos caldos no inoculados como controles negativos.

#### 3.5.1.1 Protocolo de una etapa de incubación

Después de la incubación se obtuvieron las  $DO_{630nm}$  del crecimiento en lector de placas microtiter (DYNEX Technologies Inc., Vancouver, Canadá). A continuación los caldos fueron aspirados, los pocillos lavados con 150  $\mu$ L de agua destilada y las placas se secaron a 35,5°C durante 20 minutos.

Las biopelículas adheridas en los pocillos fueron teñidas con 130  $\mu$ L de cristal violeta al 1% (Panreac, Barcelona, España) durante 5 minutos, después el colorante fue retirado y los pocillos lavados 4 veces con 150  $\mu$ L de agua destilada. Seguidamente las placas se dejaron secar a temperatura ambiente durante 1 hora, luego se añadió 130  $\mu$ L de etanol absoluto (Panreac) a cada pocillo y se realizaron lecturas de las  $DO_{570nm}$  a los cinco minutos.

Para medir la capacidad de formación de biopelícula fueron utilizadas tres fórmulas:

1.  $FB_1 = DO_{b570nm} - DO_{c570nm}$  (Kadurugamuwa et al., 2003);
2.  $FB_2 = DO_{b570nm} / DO_{c570nm}$  (Soto et al., 2006) y
3.  $FEB = (DO_{b570nm} - DO_{c570nm}) / DO_{c630nm}$  (Niu y Gilbert, 2004)

En las cuales *FB* son los índices de formación de biopelícula, *FEB* es el índice de formación específica de biopelícula, *DO<sub>b570nm</sub>* la densidad óptica a 570 nm de las bacterias adheridas, *DO<sub>c570nm</sub>* la densidad óptica a 570 nm del pocillo teñido conteniendo caldo no inoculado (para eliminar valores inespecíficos o abióticos) y *DO<sub>c630nm</sub>* la densidad óptica a 630 nm del crecimiento bacteriano en caldo.

#### 3.5.1.2 Protocolo de dos etapas de incubación

En este protocolo, las cepas fueron cultivadas de la misma manera que en el protocolo de una etapa pero tras la incubación a 30°C durante 24 horas se transfirieron inóculos de 1,3 µL de cada cepa a otra placa microtiter conteniendo 130 µL de caldo por pocillo. Esta segunda placa se incubó otras 24 horas a 30°C y se procesó como se ha descrito en el protocolo anterior.

Todos los ensayos fueron realizados por triplicado, lo que resultó en un total de 48 pocillos por cada cepa estudiada, medio de cultivo, protocolo y fórmula matemática.

#### **3.5.2 Estandarización de la metodología para estudios ulteriores**

Definidas las condiciones óptimas para el estudio de formación de biopelícula por las cepas de *E. coli* se eligieron el caldo M63, el protocolo de una etapa de incubación y la fórmula matemática que consideraba las bacterias adheridas, los factores inespecíficos y el crecimiento bacteriano:

$$FEB = (DO_{b570nm} - DO_{c570nm}) / DO_{c630nm}.$$

En los siguientes estudios, las 15 cepas fueron procesadas con esta metodología, pero con el objetivo de minimizar variaciones en los resultados debidas a la técnica, los lavados de las placas fueron realizados en un lavador automatizado (DAS, Roma, Italia).

### **3.5.3 Análisis microscópicos**

Las imágenes microscópicas fueron obtenidas por microscopía confocal (CLSM – *Confocal Laser Scanning Microscopy*) como se ha descrito previamente (Harrison et al., 2006), con algunas modificaciones. Cinco cepas (dos formadoras fuertes de biopelículas y tres débiles) se cultivaron en 200 µL de caldo M63 por pocillo en el dispositivo de biopelícula Calgary (Innovotech Edmonton, AB, Canadá) bajo las mismas condiciones estandarizadas para la formación de biopelícula. Ese dispositivo consta de una placa microtiter de 96 pocillos y de una tapa con proyecciones hacia dentro de los pocillos que son los sustratos para la adherencia y formación de las biopelículas.

Tras la incubación, las proyecciones fueron lavadas por inmersión en 200 µL de SSE en otra placa y seguidamente fueron secadas en estufa a 35,5°C durante 20 minutos. Las biopelículas adheridas a las proyecciones fueron fijadas en otra placa con etanol absoluto durante dos minutos, lavadas con SSE y a continuación teñidas con naranja de acridina (Becton Dickinson) durante 10 minutos a 30°C en la oscuridad. Finalmente se lavaron otra vez con SSE.

Las proyecciones fueron retiradas de la tapa con una pinza estéril, colocadas sobre dos gotas de SSE en un cubreobjetos de vidrio y examinadas

por CLSM. Las imágenes confocales fueron obtenidas con el objetivo de inmersión de 63 aumentos de un microscopio confocal Leica DCS-SP2 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania).

### **3.6 INHIBICIÓN DE LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS**

#### **3.6.1 Compuestos utilizados**

Se evaluó el efecto de los siguientes compuestos obtenidos de Sigma-Aldrich: Albúmina sérica humana (HSA), sal sódica de ibuprofeno (IBU) y N-acetil-L-cisteína (NAC) en el crecimiento y en la formación de biopelícula por 7 cepas de *E. coli* identificadas previamente como formadoras fuertes de biopelícula.

#### **3.6.2 Efectos de los compuestos en solución**

Los efectos de los compuestos en solución sobre el crecimiento y en la formación de biopelícula fueron estudiados utilizando concentraciones de 8, 125, 2.000 y 32.000 mg/L de HSA, de 2, 8, 30 y 125 mg/L de IBU y de 8, 30, 125, 500, y 2.000 mg/L de NAC.

Tras llevar a cabo la incubación en caldo LB a 35,5°C durante 24 horas, se realizaron diluciones al 1/100 de cada cultivo en caldo M63 puro y con las diferentes concentraciones de los compuestos ensayados. Alícuotas de 130 µL fueron transferidas a pocillos de placas microtiter de poliestireno que se incubaron

bajo las mismas condiciones y metodología estandarizadas en el estudio de formación de biopelícula previamente descritas.

Tras el periodo de incubación fueron medidas las  $DO_{630nm}$  del crecimiento y la concentración mínima inhibitoria (CMI) definida como la menor concentración de cada compuesto capaz de reducir al menos a la mitad la densidad del crecimiento respecto a los pocillos control no tratados. Seguidamente, fueron estudiados los efectos de las concentraciones subinhibitorias de los compuestos sobre la formación de biopelícula respecto a los controles no tratados.

Se definió la concentración mínima inhibitoria de biopelícula (CMIB) como la concentración más baja del compuesto que produjo una reducción significativa en la formación de la biopelícula comparada a los pocillos control.

### **3.6.3 Efectos del tratamiento previo de material abiótico con los compuestos**

Los pocillos fueron tratados previamente con 150  $\mu$ L de HSA a las concentraciones de 8 y 32.000 mg/L, IBU a 125 mg/L, NAC a 1.000 mg/L y con las combinaciones entre las dos concentraciones estudiadas de HSA con IBU a 125 mg/L o NAC a 1.000mg/L. Todos los compuestos fueron disueltos en caldo M63 y también se incluyeron pocillos control tratados con caldo M63 puro.

Los pocillos de las placas microtiter fueron tratados incubándose con los compuestos durante una hora a 35,5°C, después se lavaron asépticamente con la misma cantidad de caldo M63 estéril y se secaron a 35,5°C durante 20 minutos.



La formación de biopelícula en los pocillos tratados previamente fue estudiada con la misma metodología descrita anteriormente.

### **3.7 ACTIVIDAD DE ANTIMICROBIANOS FRENTE A BACTERIAS PLANCTÓNICAS Y ASOCIADAS A BIOPELÍCULAS**

#### **3.7.1 Antimicrobianos**

Se utilizaron los siguientes antimicrobianos: amoxicilina y amoxicilina/ácido clavulánico (GlaxoSmithKline, Madrid, España), cefotaxima y gentamicina (Sigma-Aldrich) y ciprofloxacina (Bayer AG, Leverkusen, Alemania).

#### **3.7.2 Sensibilidad a los antimicrobianos**

Las CMI's fueron determinadas por ensayos de microdilución en caldo siguiendo las recomendaciones del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2006).

#### **3.7.3 Sensibilidad a los antimicrobianos por el método del Azul de Alamar**

El colorante vital Azul de Alamar (Alamar Blue – AB, Trek Diagnostic Systems, Oxford, Inglaterra) incorpora un indicador de oxidación-reducción que cambia de color o presenta fluorescencia en respuesta a la reducción química del medio de cultivo resultante del metabolismo por crecimiento bacteriano.

Para la determinación del porcentaje del metabolismo del AB se utilizaron las fórmulas del fabricante para el ajuste de las lecturas de absorbancia con los filtros disponibles ( $DO_{530nm}$  y  $DO_{630nm}$ ). El primer paso fue calcular el factor de corrección para filtros diferentes con la siguiente fórmula:

$$R_0 = AO_{530nm} / AO_{630nm}$$

Donde:

$R_0$  = factor de corrección para filtros diferentes

$AO_{530nm} = (DO_{530nm} \text{ forma oxidada AB en MH-II}) - (DO_{530nm} \text{ MH-II puro})$

$AO_{630nm} = (DO_{630nm} \text{ forma oxidada AB en MH-II}) - (DO_{630nm} \text{ MH-II puro})$

Luego se calculó el porcentaje del metabolismo del AB por las bacterias en cada pocillo utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de metabolismo del AB} = [A_{530nm} - (A_{630nm} \times R_0)] \times 100$$

Donde:

$A_{530nm} = (DO_{530nm} \text{ AB pocillo-prueba}) - (DO_{530nm} \text{ AB pocillo-control})$

$A_{630nm} = (DO_{630nm} \text{ AB pocillo-prueba}) - (DO_{630nm} \text{ AB pocillo-control})$

### 3.7.3.1 Correlación entre el porcentaje de metabolismo del Azul de Alamar y recuentos bacterianos

Para verificar la correlación entre el metabolismo del AB y el número de bacterias viables por recuentos se ejecutaron en paralelo las dos técnicas con la cepa EcATCC.

Preliminarmente, la cepa fue incubada a 35,5°C durante 19 horas en 5 mL de caldo MH-II. A continuación se prepararon diluciones decimales del cultivo hasta  $10^{-6}$ , se transfirieron 100  $\mu$ L tanto del cultivo directo como de cada dilución a pocillos de una placa microtiter y se añadieron 5  $\mu$ L del reactivo AB por pocillo. Las placas fueron agitadas suavemente e incubadas a 35,5°C durante una hora, finalmente se leyeron las DO y se calcularon los porcentajes del metabolismo del AB siguiendo las recomendaciones del fabricante.

En paralelo se sembraron 100  $\mu$ L de las diluciones del cultivo en placas de TSS y tras la incubación a 35,5°C durante 24 horas, se realizaron recuentos bacterianos que fueron expresados como  $\log_{10}$  ufc/mL.

### 3.7.3.2 Sensibilidad de las bacterias planctónicas

La sensibilidad de las bacterias planctónicas a los antimicrobianos fue estudiada según el método descrito por Pettit et al., 2005. En los ensayos de sensibilidad de las bacterias planctónicas se ajustaron los inóculos iniciales de las siete cepas de *E. coli* formadoras fuertes de biopelícula a 5,7  $\log_{10}$  ufc/mL, además se procuró seguir las recomendaciones del CLSI, la única diferencia fue que a las 19 horas de incubación se les añadieron a los pocillos 5  $\mu$ L de AB. De forma inmediata a la adición del AB a los pocillos se agitó suavemente la placa y después se incubó a 35,5°C durante una hora.

Tras la incubación, la placa fue nuevamente agitada a fin de homogenizar los contenidos de los pocillos. Se leyeron las  $DO_{530nm}$  y  $DO_{630nm}$  y se calcularon las diferencias entre los porcentajes de metabolismo del AB en los pocillos con las concentraciones de los antimicrobianos y en los pocillos control con la siguiente fórmula definida por el fabricante:

$$\% \text{ difmet AB} = \frac{A_{530nm} - (A_{630nm} \times R_0) \text{ pocillo con antimicrobiano}}{A_{530nm} - (A_{630nm} \times R_0) \text{ pocillo control no tratado}} \times 100$$

Donde:

% difmet AB = Porcentaje de la diferencia de metabolismo del AB entre pocillo con antimicrobiano y pocillo control no tratado.

Las concentraciones mínimas inhibitorias de los antimicrobianos que propiciaron la disminución en un 50% del metabolismo del AB por las bacterias planctónicas respecto al metabolismo en los pocillos control fueron consideradas como CMI-AB<sub>50</sub> y las que disminuyeron el 80% como CMI-AB<sub>80</sub> (Ramage et al. 2001; Pettit et al., 2005; Repp et al., 2007).

### 3.7.3.3 Sensibilidad de las bacterias asociadas a biopelícula

Las biopelículas fueron formadas bajo las mismas condiciones previamente descritas para el ensayo de su formación. Tras la incubación se retiraron los 100 µL del caldo crecido en cada pocillo, se añadieron 100 µL de caldo MH-II fresco solo o con las concentraciones suprainhedoras de los antimicrobianos estudiados. Después las placas fueron nuevamente incubadas

a 35,5°C durante 19 horas y procesadas como las del ensayo para la sensibilidad de las bacterias planctónicas. Seguidamente se determinaron las CMIBs-AB<sub>50</sub> y CMIBs-AB<sub>80</sub> como se ha descrito previamente.

### **3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado en ensayos independientes. Las variables cuantitativas generadas – índices de formación de biopelícula – fueron analizados descriptivamente, se calcularon medias, desviaciones estándar y cuartiles. Los análisis estadísticos fueron realizados siguiendo las recomendaciones de Ilstrup, 1990.

Para evaluar el significado de las diferencias entre los caldos M63 y M9 y entre los protocolos de una y de dos etapas de incubación se empleó la Prueba *t* de Student de doble cola para datos no pareados ( $p < 0,05$ )

Las relaciones entre las variables cualitativas (capacidad de formación de biopelícula, serotipos, presencia de factores de virulencia y resistencia a los antimicrobianos) fueron estudiadas por la prueba de Fisher de doble cola ( $p < 0,05$ ).

Los efectos de los compuestos en la formación de biopelícula fueron expresados como porcentaje del índice FEB respecto a controles no tratados y las diferencias fueron evaluadas con la Prueba *t* de Student de doble cola para datos pareados ( $p \leq 0,01$ ). La comparación entre los tratamientos con distintos compuestos se llevó a cabo con la misma prueba pero para datos no pareados ( $p \leq 0,01$ ).

Se trazaron líneas de regresión y se calcularon los coeficientes de correlación ( $R^2$ ) en estudios de correlación entre el índice FEB y grosor de la biopelícula visto en las reconstrucciones en tres dimensiones de las imágenes CLSM y también entre el metabolismo del AB y los recuentos bacterianos.



## 4. RESULTADOS

### 4.1 SEROTIPADO Y CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS FACTORES DE VIRULENCIA DE LA SUPERFICIE BACTERIANA

En la tabla 3 están expuestos los serotipos y la expresión fenotípica de factores de virulencia asociados a la superficie bacteriana de las 15 cepas de *E. coli* estudiadas.

**Tabla 3.** Serotipos y factores de virulencia asociados a la superficie bacteriana de 15 cepas de *E. coli*.

| Cepa          | Serotipo                         | Factores de virulencia |           |      |       |
|---------------|----------------------------------|------------------------|-----------|------|-------|
|               |                                  | FP                     | MRHA tipo | MSHA | Curli |
| <b>Ec1</b>    | O6:H1                            | -                      | III       | +    | +     |
| <b>Ec2</b>    | O <sub>NT</sub> :H <sub>NT</sub> | -                      | -         | +    | +     |
| <b>Ec3</b>    | O25:H4                           | -                      | -         | +    | -     |
| <b>Ec9152</b> | O75:H7                           | -                      | -         | +    | -     |
| <b>Ec9153</b> | O1:H1                            | -                      | -         | -    | -     |
| <b>Ec9154</b> | O101:H <sub>NM</sub>             | -                      | -         | -    | -     |
| <b>Ec9156</b> | O6:H1                            | -                      | -         | +    | -     |
| <b>Ec9165</b> | O2:H <sub>NM</sub>               | +                      | IVa       | +    | +     |
| <b>Ec9173</b> | O51:H49                          | -                      | -         | -    | +     |
| <b>Ec9175</b> | O18:H <sub>NM</sub>              | +                      | IVa       | -    | +     |
| <b>Ec9176</b> | O75:H5                           | -                      | III       | +    | -     |
| <b>Ec9180</b> | O6:H <sub>NM</sub>               | +                      | IVa       | -    | -     |
| <b>Ec9182</b> | O2:H1                            | -                      | III       | +    | +     |
| <b>Ec9192</b> | O18:H7                           | -                      | -         | +    | +     |
| <b>EcATCC</b> | O6:H1                            | +                      | IVa       | +    | -     |

NT: no tipable; NM: no móvil

Abreviaturas de los factores de virulencia en material y métodos



El serotipo más frecuente fue el O6:H1 identificado en tres cepas (20%). Cuatro cepas (26,7%) eran inmóviles y carecían de antígenos H y en una cepa (6,7%) ambos antígenos fueron no-tipables.

La expresión fenotípica de factores de virulencia en la superficie bacteriana fue variable: MSHA fue observada en 10 cepas (66,7%), MRHA y curli en siete (46,7%) y FP en cuatro (26,7%).

#### **4.2 DETECCIÓN DE GENES DE VIRULENCIA**

En la tabla 4 se recogen los genes de virulencia que codifican para adhesinas que mostraron las 15 cepas de *E. coli* estudiadas. Los genes *afa/draBC*, *bmaE*, *gafD* y *nfaE* no fueron detectados por lo que no se han incluido en la tabla.

**Tabla 4.** Genes de virulencia que codifican para adhesinas detectados en las 15 cepas de *E. coli*.

| Cepa   | Adhesina    |             |                  |             |             |            |                        | F9 | Type 3 | <i>agn43</i> |
|--------|-------------|-------------|------------------|-------------|-------------|------------|------------------------|----|--------|--------------|
|        | <i>papC</i> | <i>papG</i> | <i>sfa/focDE</i> | <i>sfaS</i> | <i>focG</i> | <i>iha</i> | <i>fimH/fimA</i> vMT78 |    |        |              |
| Ec1    | +           | III         | +                | -           | -           | -          | +/-                    | +  | -      | +            |
| Ec2    | -           | -           | -                | -           | -           | -          | +/-                    | +  | +      | +            |
| Ec3    | -           | -           | -                | -           | -           | +          | +/-                    | +  | -      | +            |
| Ec9152 | -           | -           | +                | -           | -           | -          | +/-                    | +  | -      | -            |
| Ec9153 | +           | + NT        | -                | -           | -           | +          | +/+                    | +  | -      | +            |
| Ec9154 | -           | -           | -                | -           | -           | -          | -/-                    | -  | +      | +            |
| Ec9156 | -           | -           | +                | -           | +           | -          | +/-                    | +  | -      | +            |
| Ec9165 | +           | II          | +                | -           | +           | +          | +/-                    | +  | -      | +            |
| Ec9173 | -           | -           | -                | -           | -           | -          | +/+                    | +  | -      | +            |
| Ec9175 | +           | II          | +                | -           | +           | +          | +/-                    | +  | -      | +            |
| Ec9176 | +           | III         | +                | -           | +           | -          | +/-                    | +  | -      | -            |
| Ec9180 | +           | II          | +                | -           | +           | +          | +/-                    | +  | -      | +            |
| Ec9182 | +           | III         | +                | +           | +           | +          | +/-                    | +  | -      | +            |
| Ec9192 | -           | -           | +                | +           | -           | -          | +/+                    | +  | -      | +            |
| EcATCC | +           | II          | +                | -           | +           | +          | +/-                    | +  | -      | +            |

NT: no tipable

Abreviaturas de los factores de virulencia en material y métodos

Los genes de adhesinas más frecuentes fueron *fimH* y F9 ya que fueron detectados en 14 cepas (93,3%), y *agn43* detectado en 13 (86,7%). Los genes menos frecuentes entre los detectados fueron *sfaS* y fimbria tipo 3, ambos encontrados en dos cepas (13,3%) y *fimA* vMT78 detectado en tres cepas (20%).

La correlación entre la detección de genes de adhesinas y su expresión fenotípica se mostró variable. De las 14 cepas con el gen *fimH*, 10 (71,4%) presentaron actividad MSHA positiva. Los genes *pap* y *sfa/focDE* fueron detectados en ocho y 10 cepas respectivamente, esos genes codifican algunas de las adhesinas responsables de la hemaglutinación resistente a manosa (MRHA) que fue detectada en siete cepas. Más específicamente, se demostró

la presencia de fimbrias P (codificadas por los genes *pap*) en 4 cepas (50%) de las ocho que presentaron esos genes. Otra observación fue que las cepas que presentaron la coexistencia de los cuatro genes de adhesinas *pap*, *sfa/focDE*, *focG* y *fimH* expresaron dos o más factores de virulencia asociados a la superficie que resultó estadísticamente significativo ( $p = 0,02$ ) respecto al otro grupo de cepas con menor número de esos genes de adhesinas.

En la tabla 5 se muestran los genes de virulencia que codifican para toxinas y para sideróforos en las 15 cepas estudiadas.

**Tabla 5.** Genes de virulencia que codifican para toxinas y para sideróforos detectados en las 15 cepas de *E. coli*.

| Cepa   | Toxina      |             |            |            | Sideróforo  |             |                  |
|--------|-------------|-------------|------------|------------|-------------|-------------|------------------|
|        | <i>hlyA</i> | <i>cnf1</i> | <i>sat</i> | <i>tsh</i> | <i>iroN</i> | <i>fyuA</i> | <i>iucD/iutA</i> |
| Ec1    | +           | +           | -          | -          | +           | +           | -/-              |
| Ec2    | -           | -           | -          | -          | -           | -           | -/-              |
| Ec3    | -           | -           | +          | -          | +           | +           | +/+              |
| Ec9152 | +           | +           | -          | -          | -           | +           | -/-              |
| Ec9153 | -           | -           | +          | -          | -           | +           | +/+              |
| Ec9154 | -           | -           | -          | -          | -           | +           | +/+              |
| Ec9156 | +           | +           | -          | -          | -           | +           | +/+              |
| Ec9165 | +           | +           | +          | -          | +           | +           | +/+              |
| Ec9173 | -           | -           | -          | -          | -           | -           | -/-              |
| Ec9175 | +           | -           | +          | -          | -           | +           | +/+              |
| Ec9176 | +           | +           | -          | -          | -           | +           | -/-              |
| Ec9180 | +           | +           | +          | -          | +           | +           | +/+              |
| Ec9182 | +           | +           | +          | -          | +           | +           | +/+              |
| Ec9192 | -           | -           | -          | +          | +           | +           | +/+              |
| EcATCC | +           | -           | +          | -          | +           | +           | +/+              |

Abreviaturas de los factores de virulencia en material y métodos

El gen de toxina más frecuente fue *hlyA* detectado en nueve cepas (60%), *cnf1* y *sat* en siete (46,7%) y *tsh* en solo una (6,7%). Los sideróforos *fyuA* fueron detectados en 13 cepas (86,7%), *iucD* y *iutA* en 10 (66,7%) e *iroN* en siete (46,7%).

La presencia de al menos tres genes de adhesinas (*pap*, *sfa/focDE*, *focG* o *fimH*) se correlacionó significativamente con los genes *hlyA* ( $p = 0,0014$ ) y *cnf1* ( $p = 0,04$ ). Además, los genes que codifican para sideróforos *iucD* y *iutA* se asociaron de manera significativa con la adhesina receptora de sideróforos *iha* ( $p = 0,0013$ ).

En la tabla 6 se muestran los genes que codifican para protectinas / invasinas así como la isla de patogenicidad *malX*. En ninguna de las cepas se detectaron los genes *kpsMT III* y *cvaC*.

**Tabla 6.** Genes de virulencia que codifican para protectinas / invasinas y la isla de patogenicidad *malX* detectados en las 15 cepas de *E. coli*.

| Cepa          | Protectina / invasina |                |             |             | <i>malX</i> |
|---------------|-----------------------|----------------|-------------|-------------|-------------|
|               | <i>kpsM II</i>        | K1 <i>neuC</i> | <i>traT</i> | <i>ibeA</i> |             |
| <b>Ec1</b>    | +                     | -              | -           | -           | +           |
| <b>Ec2</b>    | -                     | -              | +           | -           | -           |
| <b>Ec3</b>    | +                     | -              | +           | -           | +           |
| <b>Ec9152</b> | +                     | +              | -           | +           | +           |
| <b>Ec9153</b> | +                     | +              | +           | -           | +           |
| <b>Ec9154</b> | -                     | -              | +           | -           | -           |
| <b>Ec9156</b> | +                     | -              | +           | -           | +           |
| <b>Ec9165</b> | +                     | -              | -           | -           | +           |
| <b>Ec9173</b> | -                     | -              | -           | -           | -           |
| <b>Ec9175</b> | +                     | -              | -           | -           | +           |
| <b>Ec9176</b> | +                     | -              | +           | +           | +           |
| <b>Ec9180</b> | +                     | -              | -           | -           | +           |
| <b>Ec9182</b> | +                     | -              | -           | -           | +           |
| <b>Ec9192</b> | +                     | +              | +           | +           | +           |
| <b>EcATCC</b> | +                     | -              | -           | -           | +           |

Abreviaturas de los factores de virulencia en material y métodos

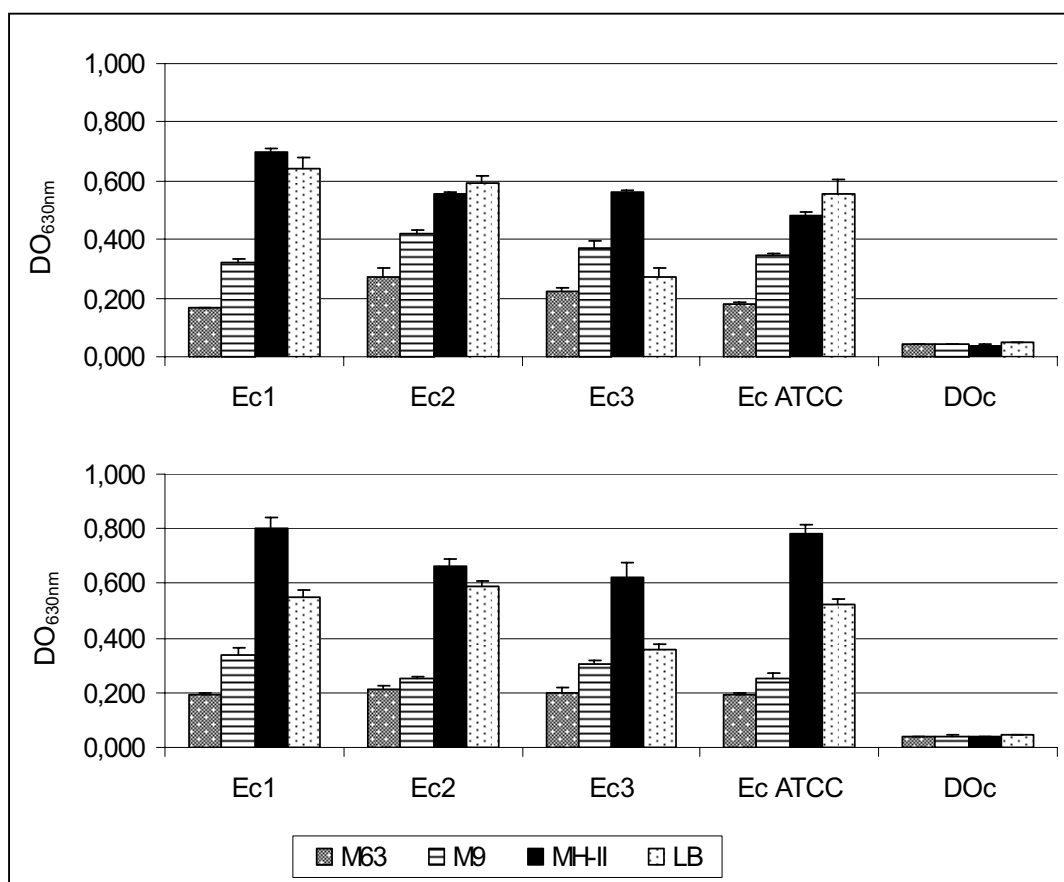
Los genes para protectinas / invasinas más frecuentes fueron: *kpsM II* detectado en 12 cepas (80%) y *traT* en siete (46,7%). El gen *ibeA* fue detectado en tres cepas (20%). La isla de patogenicidad *malX* fue detectada en 12 cepas (80%).

## **4.3 MÉTODOS PARA EL ESTUDIO DE FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS**

### **4.3.1 Estudios preliminares**

#### **4.3.1.1 Densidades ópticas del crecimiento**

En la figura 10 se muestran las  $DO_{630nm}$  (media  $\pm$  DE) que reflejan el crecimiento alcanzado por las cuatro cepas de *E. coli* en los cuatro caldos utilizados así como la  $DO_{630nm}$  de los pocillos con los distintos caldos no inoculados en los protocolos de una y dos etapas de incubación.



DOc: DO<sub>630nm</sub> pocillos control no inoculados  
 Protocolo de una etapa (panel superior) y de dos etapas (panel inferior) de incubación

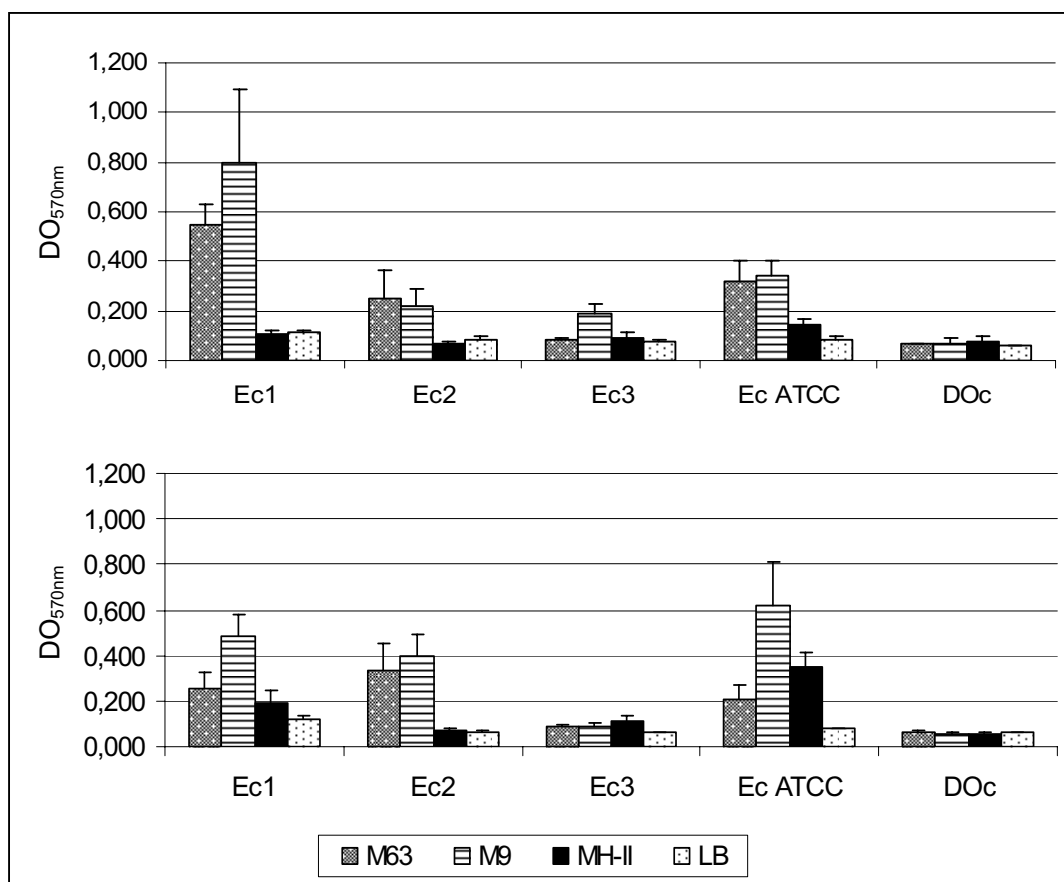
**Figura 10.** DO<sub>630nm</sub> (media  $\pm$  DE) del crecimiento bacteriano de cuatro cepas de *E. coli* y de los pocillos control en las distintas condiciones evaluadas.

Para todas las cepas y condiciones estudiadas las DO<sub>630nm</sub> obtenidas en los caldos inoculados fueron superiores a las observadas en los pocillos control indicando que todas las cepas fueron capaces de crecer en los cuatro caldos utilizados. Asimismo, las DO<sub>630nm</sub> fueron menores en los caldos mínimos que en los caldos ricos para todas las cepas en ambos protocolos de incubación excepto para la cepa Ec3 una vez que en el protocolo de una etapa de

incubación presentó en el caldo M9  $DO_{630nm}$  superiores a las observadas en caldo LB.

#### 4.3.1.2 Densidades ópticas de las bacterias adheridas a los pocillos

En la figura 11 están representadas las  $DO_{570nm}$  (media  $\pm$  DE) alcanzadas por bacterias adheridas de las cuatro cepas estudiadas y por los pocillos control teñidos por el cristal violeta, en los protocolos de una y dos etapas de incubación.



DOc: DO<sub>570nm</sub> pocillos control no inoculados  
 Protocolo de una etapa (panel superior) y de dos etapas (panel inferior) de incubación

**Figura 11.** DO<sub>570nm</sub> (media ± DE) de bacterias adheridas de cuatro cepas de *E. coli* y de los pocillos control teñidos con cristal violeta en las distintas condiciones evaluadas.

Diversos valores de DO<sub>570nm</sub> fueron encontrados dependiendo de la cepa, caldo de cultivo y protocolo. En general, todas las cepas obtuvieron densidades más altas en los caldos mínimos, Ec1 alcanzó DO<sub>570nm</sub> (0,796 ± 0,294) en el protocolo de una etapa, EcATCC (0,618 ± 0,196) y Ec2 (0,398 ± 0,091) en el de dos etapas, y Ec3 (0,192 ± 0,037) en el de una etapa, todas en



caldo M9. Además, en los caldos enriquecidos las densidades fueron menores que 0,200 para todas las cepas, excepto EcATCC que fue la única cepa que presentó valores mayores de  $DO_{570nm}$ , concretamente de  $0,351 \pm 0,060$  en caldo MH-II en el protocolo de dos etapas de incubación.

#### 4.3.1.3 Aplicación de diferentes fórmulas para cuantificar las biopelículas

Los valores de  $DO_{630nm}$  y  $DO_{570nm}$  fueron utilizados para determinar la capacidad de formación de biopelícula por medio de tres fórmulas diferentes. Los valores obtenidos fueron distribuidos en cuartiles para clasificar semicuantitativamente la capacidad de formación de biopelícula en cuatro categorías: Fuerte (F), Moderada (M), Débil (D) y No formadora (N). (Tabla 12)

**Tabla 12.** Clasificación semicuantitativa de la capacidad de formación de biopelícula en cuatro categorías utilizando tres fórmulas diferentes.

| <b>Fórmula</b>                                | <b>Fuerte<br/>(F)</b> | <b>Moderada<br/>(M)</b> | <b>Débil<br/>(D)</b> | <b>No formadora<br/>(N)</b> |
|---|-----------------------|-------------------------|----------------------|-----------------------------|
| <b><math>FB_1 = DO_b - DO_c</math></b>        | $\geq 0,300$          | $0,200 - 0,299$         | $0,100 - 0,199$      | $< 0,100$                   |
| <b><math>FB_2 = DO_b / DO_c</math></b>        | $\geq 6,10$           | $4,10 - 6,00$           | $2,00 - 4,00$        | $< 2,00$                    |
| <b><math>FEB = (DO_b - DO_c) / DOC</math></b> | $\geq 1,10$           | $0,70 - 1,09$           | $0,35 - 0,69$        | $< 0,35$                    |

$FB_1$  y  $FB_2$ : Formación de Biopelícula; FEB: Formación Específica de Biopelícula;  $DO_b$ :  $DO_{570nm}$  de las bacterias adheridas;  $DO_c$ :  $DO_{570nm}$  de pocillos con caldo no inoculado;  $DOC$ :  $DO_{630nm}$  del crecimiento bacteriano

La capacidad de las cuatro cepas estudiadas para formar biopelículas bajo las diferentes condiciones experimentales probadas está expuesta en la tabla 13.

**Tabla 13.** Categorías de formación de biopelícula por las cepas de *E. coli* bajo las diferentes condiciones experimentales.

| Caldo           | Ec1       |           | Ec2        |           | Ec3       |           | EcATCC    |           |
|-----------------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|                 | P-1       | P-2       | P-1        | P-2       | P-1       | P-2       | P-1       | P-2       |
| <b>M63</b>      |           |           |            |           |           |           |           |           |
| FB <sub>1</sub> | F (0,484) | D (0,191) | D (0,184)  | M (0,268) | N (0,015) | N (0,020) | M (0,255) | D (0,144) |
| FB <sub>2</sub> | F (8,35)  | D (3,98)  | D (3,73)   | M (5,21)  | N (1,23)  | N (1,32)  | M (4,80)  | D (3,23)  |
| FEB             | F (2,91)  | M (1,01)  | M (0,71)   | F (1,28)  | N (0,07)  | N (0,11)  | F (1,42)  | M (0,77)  |
| <b>M9</b>       |           |           |            |           |           |           |           |           |
| FB <sub>1</sub> | F (0,727) | F (0,428) | D (0,153)  | F (0,341) | D (0,122) | N (0,030) | M (0,276) | F (0,561) |
| FB <sub>2</sub> | F (13,05) | F (8,45)  | D (3,69)   | F (6,92)  | D (3,14)  | N (1,51)  | M (5,58)  | F (10,67) |
| FEB             | F (2,30)  | F (1,31)  | D (0,37)   | F (1,39)  | N (0,33)  | N (0,10)  | M (0,80)  | F (2,27)  |
| <b>MH-II</b>    |           |           |            |           |           |           |           |           |
| FB <sub>1</sub> | N (0,031) | D (0,131) | N (-0,009) | N (0,016) | N (0,018) | N (0,056) | N (0,072) | M (0,294) |
| FB <sub>2</sub> | N (1,59)  | D (3,44)  | N (0,99)   | N (1,30)  | N (1,41)  | N (1,98)  | D (2,17)  | F (6,34)  |
| FEB             | N (0,05)  | N (0,16)  | N (-0,02)  | N (0,02)  | N (0,04)  | N (0,09)  | N (0,15)  | D (0,37)  |
| <b>LB</b>       |           |           |            |           |           |           |           |           |
| FB <sub>1</sub> | N (0,058) | N (0,056) | N (0,023)  | N (0,006) | N (0,015) | N (0,002) | N (0,030) | N (0,018) |
| FB <sub>2</sub> | D (2,01)  | N (1,94)  | N (1,39)   | N (1,10)  | N (1,26)  | N (1,03)  | N (1,53)  | N (1,31)  |
| FEB             | N (0,09)  | N (0,10)  | N (0,04)   | N (0,01)  | N (0,06)  | N (0,01)  | N (0,05)  | N (0,04)  |

P-1: Protocolo de una etapa de incubación; P-2: Protocolo de dos etapas de incubación; F: Cepa formadora fuerte de biopelícula; M: Cepa formadora moderada de biopelícula; D: Cepa formadora débil de biopelícula; N: Cepa no formadora de biopelícula

La capacidad de formación de biopelícula fuerte y moderada fue observada en tres de las cuatro cepas (Ec1, Ec2 y EcATCC) pero solo en los caldos mínimos M9 y M63; en los caldos enriquecidos las cepas se comportaron como formadoras débiles o como no formadoras. La cepa EcATCC constituyó la única excepción puesto que fue clasificada como formadora moderada de biopelículas en caldo MH-II en el protocolo de dos etapas de incubación (considerando el índice FB<sub>1</sub>) o como formadora fuerte (considerando el índice FB<sub>2</sub>).

Teniendo en cuenta los dos caldos mínimos, los dos protocolos de incubación y las tres fórmulas, se obtuvieron 12 resultados por cada cepa. La cepa Ec1 fue la que mostró mayor capacidad para formar biopelícula,

presentando 9 valores como fuerte o moderada, seguida de las cepas EcATCC (con 4 fuertes y 6 moderadas) y Ec2 (con 4 fuertes y 3 moderadas). La cepa Ec3 fue clasificada como débil o no formadora de biopelícula bajo las mismas condiciones.

Como resultado de estos estudios se concluyó que de los índices calculados por las tres fórmulas, el FEB era el más adecuado puesto que tenía en cuenta todas las variables que podrían interferir en la cuantificación de la capacidad de formación de biopelícula en el sistema (crecimiento bacteriano, cantidad de bacterias adheridas y factores inespecíficos).

Considerando los índices FEB obtenidos, las categorías de formación específica de biopelícula fuerte y moderada ocurrieron solo en los caldos mínimos. En la tabla 14 se muestran los índices FEB (media  $\pm$  DE) en los caldos mínimos y con los dos protocolos.

**Tabla 14.** Índices FEB (media  $\pm$  DE) de las cuatro cepas de *E. coli* en los caldos mínimos con los protocolos de una etapa (P-1) y de dos etapas (P-2) de incubación.

| Cepa          | M63               |                   | M9                |                   |
|---------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|               | P-1               | P-2               | P-1               | P-2               |
| <b>Ec1</b>    | 2,91 $\pm$ 0,50*  | 1,01 $\pm$ 0,38   | 2,30 $\pm$ 1,03*† | 1,31 $\pm$ 0,42†  |
| <b>Ec2</b>    | 0,71 $\pm$ 0,48*  | 1,28 $\pm$ 0,56*  | 0,37 $\pm$ 0,21*† | 1,39 $\pm$ 0,40*† |
| <b>Ec3</b>    | 0,07 $\pm$ 0,03*  | 0,11 $\pm$ 0,03   | 0,33 $\pm$ 0,14*† | 0,10 $\pm$ 0,03†  |
| <b>EcATCC</b> | 1,42 $\pm$ 0,46*† | 0,77 $\pm$ 0,30*† | 0,80 $\pm$ 0,21*† | 2,27 $\pm$ 0,98*† |

\* Diferencias significativas entre los índices FEB en M63 y M9 ( $p < 0,05$ )

† Diferencias significativas entre los índices FEB en los protocolos de una y dos etapas ( $p < 0,05$ )

Las cepas Ec1 y EcATCC fueron las mayores formadoras de biopelícula, seguidas por la cepa Ec2 que produjo biopelícula fuerte solamente en el

protocolo de dos etapas de incubación, mientras la cepa Ec3 no produjo biopelícula en cualquiera de las condiciones probadas.

Se detectaron diferencias significativas entre los resultados obtenidos por todas las cepas con los medios M63 y M9 en el protocolo de una etapa, así como entre los dos protocolos con el medio M9.

#### **4.3.2 Estandarización de la metodología para estudios ulteriores**

Los estudios previos permitieron concluir que el caldo M63, el protocolo de una etapa de incubación y la cuantificación de biopelícula por el índice FEB eran las condiciones ideales para las evaluaciones posteriores.

La optimización de las condiciones de estudio permitió evaluar la capacidad de formación biopelículas en la totalidad de las 15 cepas objeto de estudio así como su correlación con los factores de virulencia en cada categoría de formación de biopelícula.

Con el objetivo de facilitar dichas correlaciones las cepas fueron agrupadas en solo dos categorías en cuanto a la capacidad de formación específica de biopelícula. Cuando el índice FEB fue  $\geq 1,0$  la cepa fue clasificada como formadora fuerte de biopelícula y cuando fue  $< 1,0$  se consideró la cepa como formadora débil.

### 4.3.3 Correlación entre la capacidad de formación de biopelícula y factores de virulencia

En la tabla 15 se recogen los índices FEB, las categorías de formación específica de biopelícula, los serotipos y los factores de virulencia asociados a la superficie de las 15 cepas de *E. coli* estudiadas.

**Tabla 15.** FEB, categoría de formación específica de biopelícula, serotipos y factores de virulencia asociados a la superficie bacteriana.

| Cepa          | FEB              | Categoría | Serotipo                         | Factor de virulencia |      |      |       |
|---------------|------------------|-----------|----------------------------------|----------------------|------|------|-------|
|               | Media $\pm$ DE   |           |                                  | FP                   | MRHA | MSHA | Curli |
| <b>Ec1</b>    | 2,37 $\pm$ 0,47  | Fuerte    | O6:H1                            | -                    | III  | +    | +     |
| <b>Ec2</b>    | 0,41 $\pm$ 0,19  | Débil     | O <sub>NT</sub> :H <sub>NT</sub> | -                    | -    | +    | +     |
| <b>Ec3</b>    | 0,03 $\pm$ 0,04  | Débil     | O25:H4                           | -                    | -    | +    | -     |
| <b>Ec9152</b> | 0,78 $\pm$ 0,30  | Débil     | O75:H7                           | -                    | -    | +    | -     |
| <b>Ec9153</b> | 0,20 $\pm$ 0,05  | Débil     | O1:H1                            | -                    | -    | -    | -     |
| <b>Ec9154</b> | -0,01 $\pm$ 0,05 | Débil     | O101:H <sub>NM</sub>             | -                    | -    | -    | -     |
| <b>Ec9156</b> | 1,57 $\pm$ 0,29  | Fuerte    | O6:H1                            | -                    | -    | +    | -     |
| <b>Ec9165</b> | 2,58 $\pm$ 0,46  | Fuerte    | O2:H <sub>NM</sub>               | +                    | IVa  | +    | +     |
| <b>Ec9173</b> | 0,06 $\pm$ 0,05  | Débil     | O51:H49                          | -                    | -    | -    | +     |
| <b>Ec9175</b> | 0,43 $\pm$ 0,18  | Débil     | O18:H <sub>NM</sub>              | +                    | IVa  | -    | +     |
| <b>Ec9176</b> | 2,06 $\pm$ 0,45  | Fuerte    | O75:H5                           | -                    | III  | +    | -     |
| <b>Ec9180</b> | 1,19 $\pm$ 0,27  | Fuerte    | O6:H <sub>NM</sub>               | +                    | IVa  | -    | -     |
| <b>Ec9182</b> | 2,01 $\pm$ 0,37  | Fuerte    | O2:H1                            | -                    | III  | +    | +     |
| <b>Ec9192</b> | 0,26 $\pm$ 0,16  | Débil     | O18:H7                           | -                    | -    | +    | +     |
| <b>EcATCC</b> | 2,50 $\pm$ 0,54  | Fuerte    | O6:H1                            | +                    | IVa  | +    | -     |

NT: no tipable; NM: no móvil

Abreviaturas de los factores de virulencia en material y métodos

Siete cepas (46,7%) obtuvieron el índice FEB superior a 1 y por lo tanto fueron clasificadas como formadoras fuertes de biopelícula. Las ocho cepas (53,3%) restantes fueron consideradas formadoras débiles.

Se observó que todas las cepas identificadas como formadoras fuertes pertenecían a los serogrupos O6, O2 u O75, además sólo la cepa Ec9152, perteneciente al serogrupo O75, fue clasificada como débil. Las cepas de los

otros serogrupos fueron clasificadas como formadoras débiles de biopelículas siendo esa diferencia significativa desde el punto de vista estadístico ( $p = 0,001$ ).

Once cepas (73,3%) fueron poseedoras de antígenos H y por lo tanto presentaron movilidad, mientras que cuatro (26,7%) fueron inmóviles. Entre las cepas móviles, predominó el antígeno H1 y cuatro de las cinco cepas que lo tenían fueron formadoras fuertes de biopelícula. Sin embargo la correlación entre la formación de biopelícula y presencia de antígenos H o movilidad no fue estadísticamente significativa ya que hubo dos cepas no móviles (Ec9165 y Ec9180) que fueron formadoras fuertes de biopelícula.

El único de los factores de virulencia asociados a la superficie bacteriana estudiados cuya frecuencia fue significativamente mayor en las cepas formadoras fuertes de biopelícula, fue la actividad de MRHA que denota la expresión de fimbrias P, S u otras adhesinas ( $p = 0,01$ ).

La correlación entre los genes de factores de virulencia y las categorías de formación específica de biopelícula está reflejada en la tabla 16.

**Tabla 16.** Correlación entre los genes de factores de virulencia (FV) y las categorías de formación específica de biopelícula de las 15 cepas de *E. coli*.

| Genes de FV                      | Formación Específica de Biopelícula (FEB) |                       |                      | p     |
|----------------------------------|---|-----------------------|----------------------|-------|
|                                  | Total<br>n=15 (100%)                      | Fuerte<br>n=7 (46,7%) | Débil<br>n=8 (53,3%) |       |
| <b>Adhesinas</b>                 |   |                       |                      |       |
| <i>papC</i> y alelos <i>papG</i> | 8 (53,3)                                  | 6 (85,7)              | 2 (25)               | 0,04  |
| <i>sfa/focDE</i>                 | 10 (66,7)                                 | 7 (100)               | 3 (37,5)             | 0,02  |
| <i>sfaS</i>                      | 2 (13,3)                                  | 1 (14,3)              | 1 (12,5)             |       |
| <i>focG</i>                      | 7 (46,7)                                  | 6 (85,7)              | 1 (12,5)             | 0,01  |
| <i>iha</i>                       | 7 (46,7)                                  | 4 (57,1)              | 3 (37,5)             |       |
| <i>fimH</i>                      | 14 (93,3)                                 | 7 (100)               | 7 (87,5)             |       |
| <i>fimA</i> vMT78                | 3 (20)                                    | 0                     | 3 (37,5)             |       |
| F9 cluster                       | 14 (93,3)                                 | 7 (100)               | 7 (87,5)             |       |
| type 3 cluster                   | 2 (13,3)                                  | 0                     | 2 (25)               |       |
| agn43                            | 13 (86,7)                                 | 6 (85,7)              | 7 (87,5)             |       |
| <b>Toxinas</b>                   |   |                       |                      |       |
| <i>hlyA</i>                      | 9 (60)                                    | 7 (100)               | 2 (25)               | 0,007 |
| <i>cnf1</i>                      | 7 (46,7)                                  | 6 (85,7)              | 1 (12,5)             | 0,01  |
| <i>sat</i>                       | 7 (46,7)                                  | 4 (57,1)              | 3 (37,5)             |       |
| <i>tsh</i>                       | 1 (6,7)                                   | 0                     | 1 (12,5)             |       |
| <b>Sideróforos</b>               |   |                       |                      |       |
| <i>iroN</i>                      | 7 (46,7)                                  | 5 (71,4)              | 2 (25)               |       |
| <i>fyuA</i>                      | 13 (86,7)                                 | 7 (100)               | 6 (75)               |       |
| <i>iucD/iutA</i>                 | 10 (66,7)                                 | 5 (71,4)              | 5 (62,5)             |       |
| <b>Protectinas /invasinas</b>    |   |                       |                      |       |
| <i>kpsM II</i>                   | 12 (80)                                   | 7 (100)               | 5 (62,5)             |       |
| <i>neuC K1</i>                   | 3 (20)                                    | 0                     | 3 (37,5)             |       |
| <i>traT</i>                      | 7 (46,7)                                  | 2 (28,6)              | 5 (62,5)             |       |
| <i>ibeA</i>                      | 3 (20)                                    | 1 (14,3)              | 2 (25)               |       |
| <b>Islas de patogenicidad</b>    |   |                       |                      |       |
| <i>malX</i>                      | 12 (80)                                   | 7 (100)               | 5 (62,5)             |       |
| <i>pap+sfa/focDE</i>             | 7 (46,7)                                  | 6 (85,7)              | 1 (12,5)             | 0,01  |
| <i>pap+hlyA</i> o <i>cnf1</i>    | 7 (46,7)                                  | 6 (85,7)              | 1 (12,5)             | 0,01  |

Abreviaturas de los factores de virulencia en material y métodos

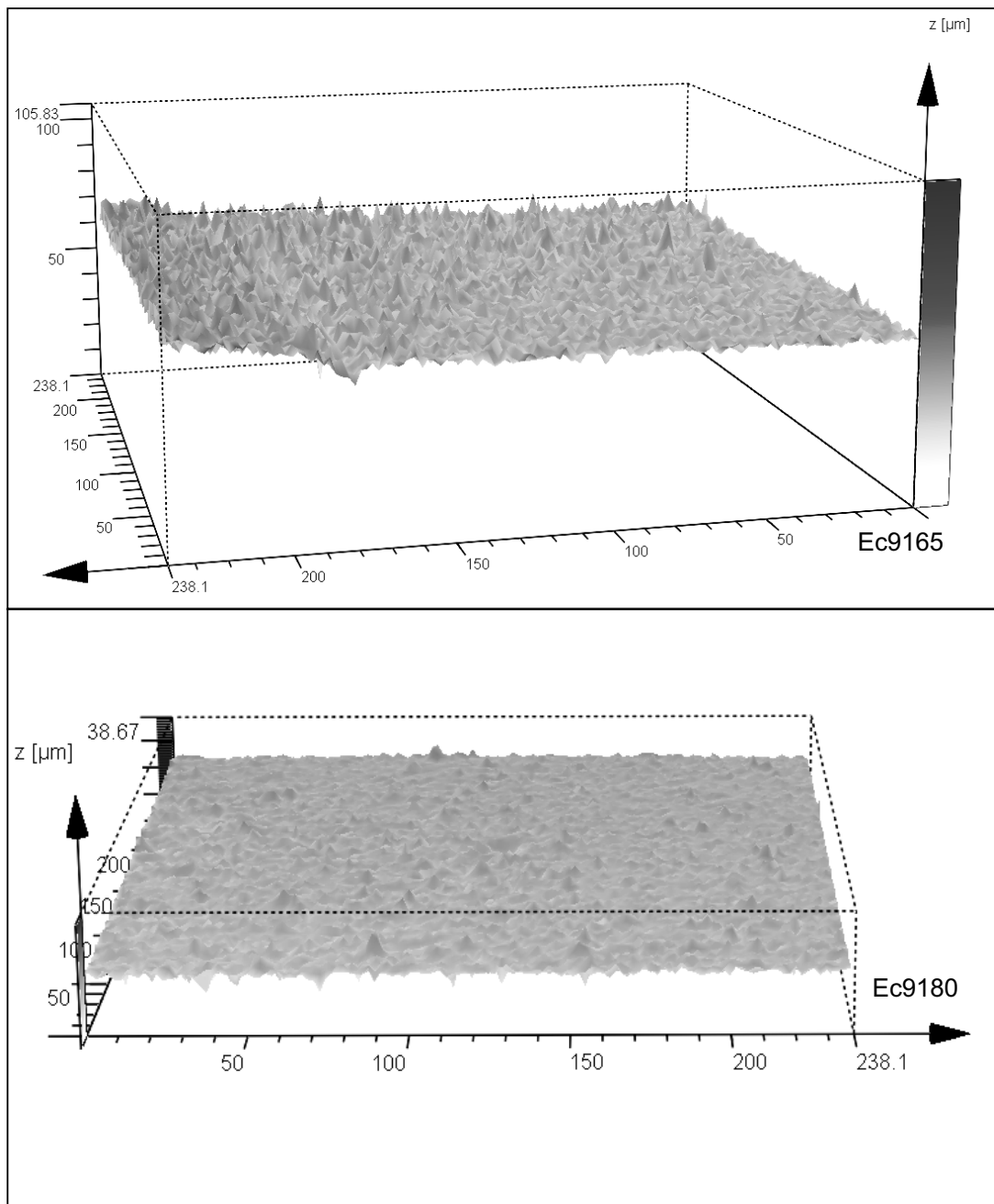
De los 30 genes estudiados, 5 (16,7%) fueron estadísticamente más frecuentes en las cepas formadoras fuertes de biopelículas: *papC* y los alelos *papG* ( $p = 0,04$ ), *sfa/focDE* ( $p = 0,02$ ), *focG* ( $p = 0,01$ ), *hlyA* ( $p = 0,007$ ) y *cnf1* ( $p = 0,01$ ).

La isla de patogenicidad *malX* fue detectada en 12 cepas (80%) y las tres restantes que carecían de ella fueron formadoras débiles de biopelícula. Adicionalmente se estudió la coexistencia de los genes *pap* y *sfa/focDE*, o *pap*, *hlyA* y/o *cnf1* como indicadores de islas de patogenicidad, siete cepas (46,7%) albergaron una u otra combinación, de estas 6 (85,7%) fueron formadoras fuertes de biopelículas y una (14,3%) formadora débil, ambas combinaciones fueron más frecuentes en las formadoras fuertes ( $p = 0,01$ ) y a parte de eso, sólo una formadora fuerte (Ec9156) no tenía los genes *pap* presentes en las dos combinaciones.

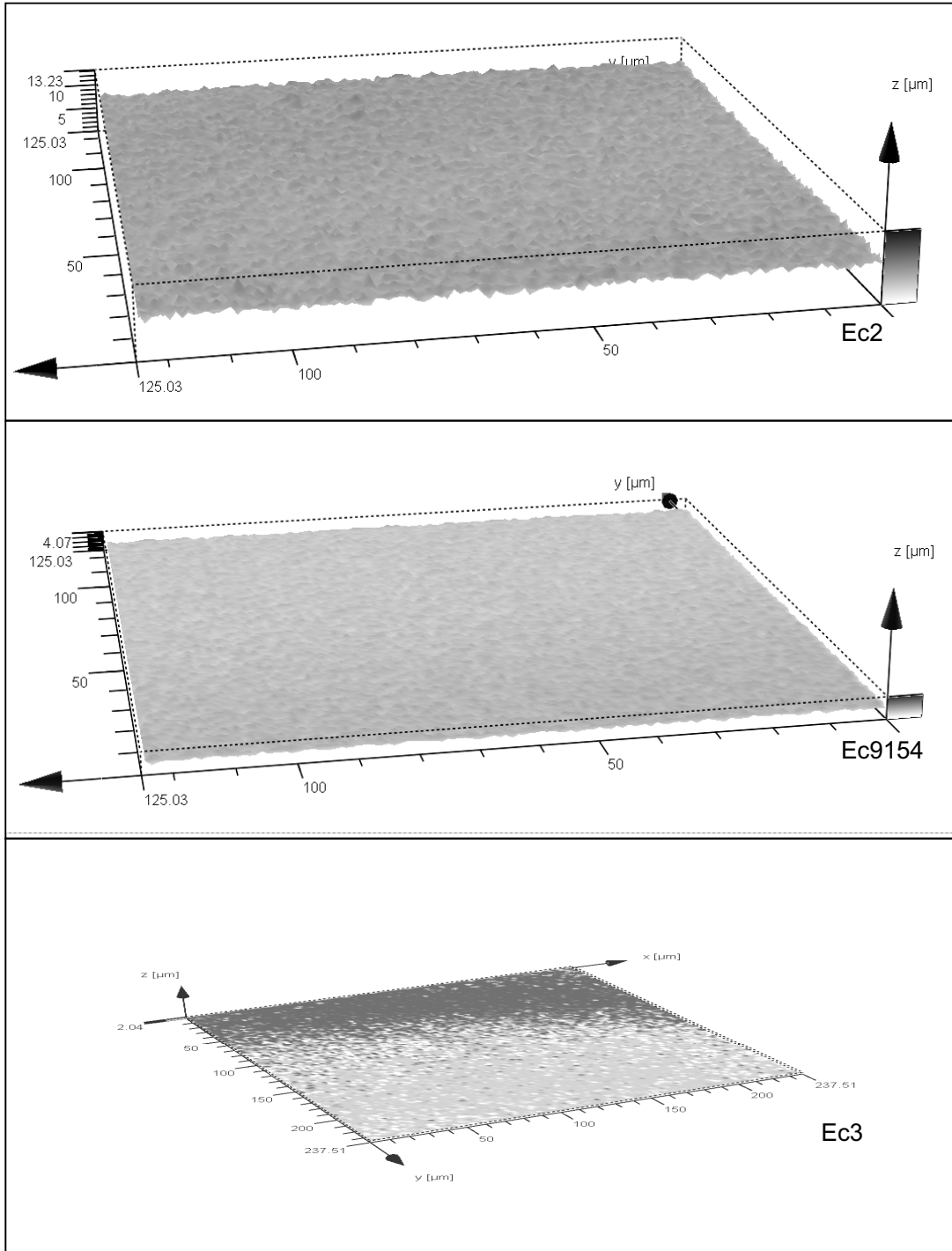
#### **4.3.4 Análisis microscópicos**

En las figuras 10 y 11 se muestran las reconstrucciones tridimensionales de las biopelículas generadas por las imágenes de microscopía confocal de las cinco cepas estudiadas: dos formadoras fuertes y tres débiles. A partir de estas reconstrucciones se realizaron análisis semicuantitativos y cualitativos.





**Figura 10.** Reconstrucción tridimensional de las imágenes de microscopía confocal de dos cepas de *E. coli* formadoras fuertes de biopelícula.

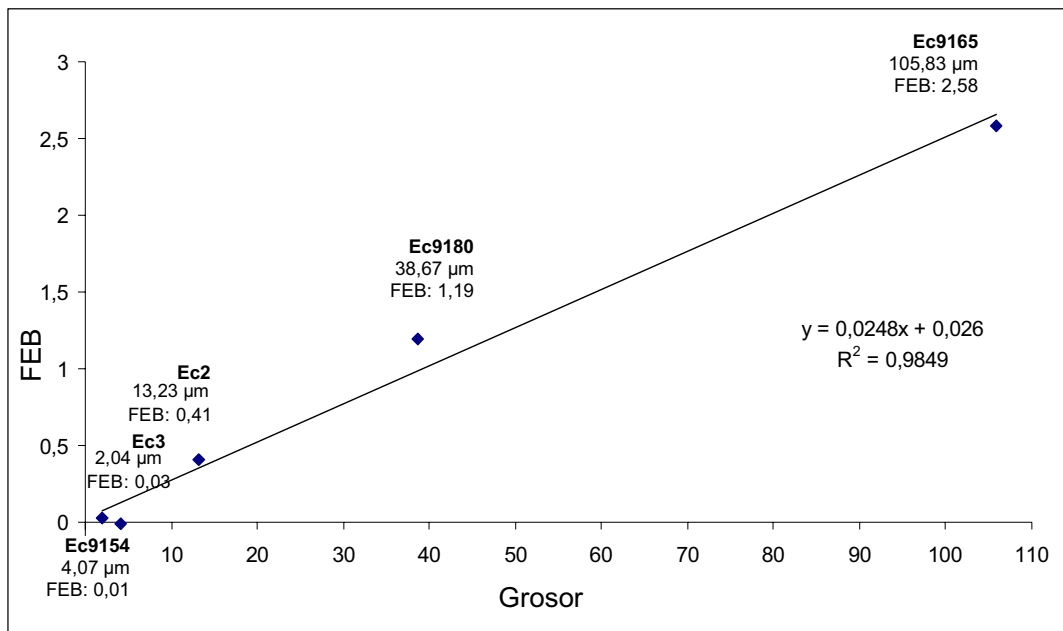


**Figura 11.** Reconstrucción tridimensional de las imágenes de microscopía confocal de tres cepas de *E. coli* formadoras débiles de biopelícula.

En cuanto a los análisis semicuantitativos, las dos cepas formadoras fuertes de biopelículas produjeron biopelículas con mayor grosor, siendo de 105,83  $\mu\text{m}$  en la cepa Ec9165 y de 38,67  $\mu\text{m}$  en la cepa Ec9180. Las tres formadoras débiles (Ec2, Ec9154 y Ec3) presentaron biopelículas cuyo grosor fue de 13,23  $\mu\text{m}$ , 4,07  $\mu\text{m}$  y 2,04  $\mu\text{m}$ , respectivamente.

En las imágenes microscópicas se pudo observar, a parte del grosor, una mayor complejidad de la superficie de las biopelículas de las cepas formadoras fuertes, con presencia de proyecciones y más irregularidades comparadas a la de las formadoras débiles.

En la figura 12 se muestra la correlación ( $R^2 = 0,9849$ ) encontrada entre los índices FEB y los grosores obtenidos en las reconstrucciones tridimensionales de las biopelículas de las cinco cepas de *E. coli* estudiadas.



**Figura 12.** Correlación entre el índice FEB y el grosor de las biopelículas visualizado en las reconstrucciones tridimensionales.

## **4.4 INHIBICIÓN DE LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS**

Para los estudios que siguen fueron seleccionadas las siete cepas de *E. coli* que eran formadoras fuertes de biopelículas.

### **4.4.1 Efectos de los compuestos en solución**

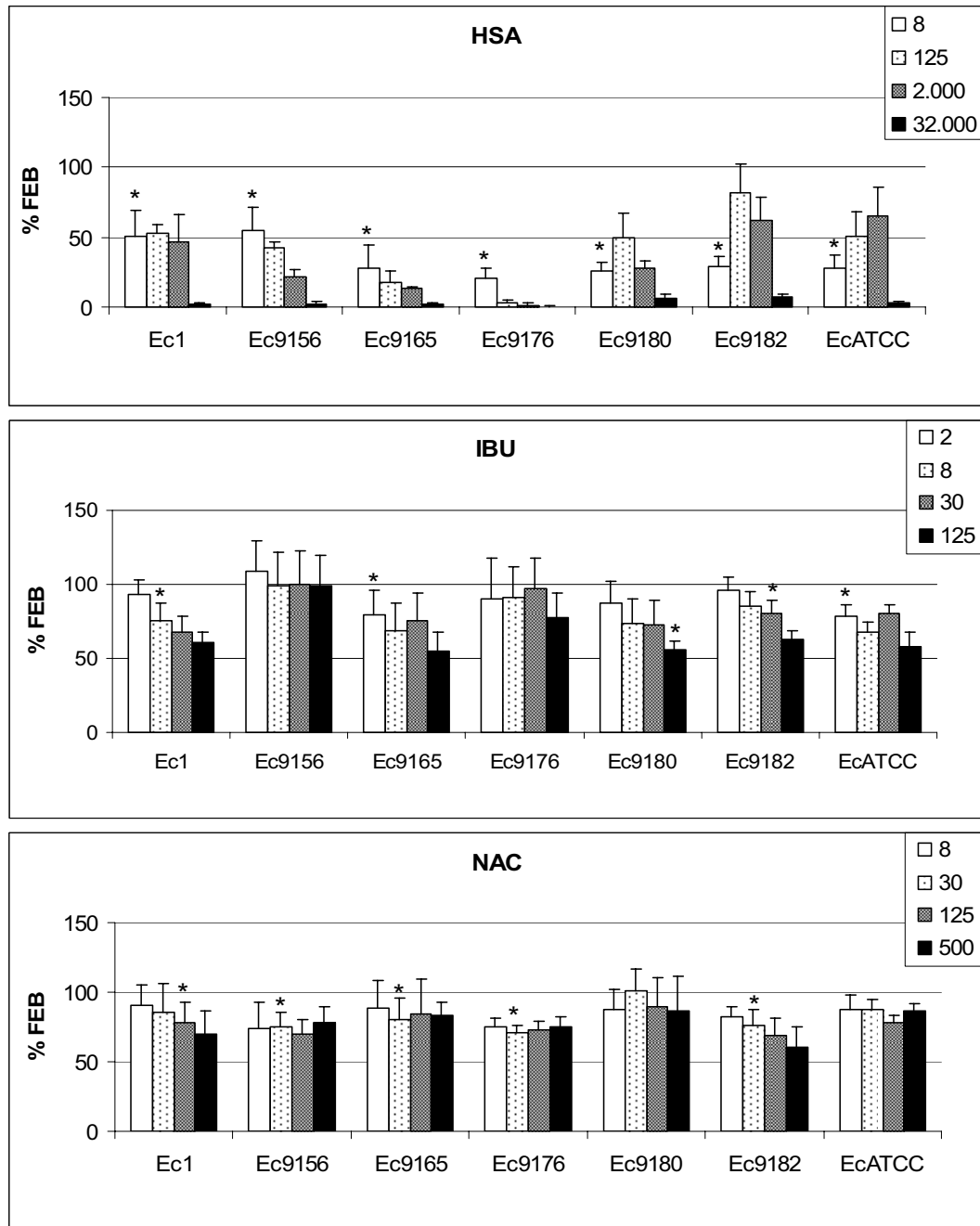
#### **4.4.1.1 Sobre el crecimiento bacteriano**

Se observaron distintos efectos de los compuestos sobre el crecimiento bacteriano. HSA no inhibió el crecimiento de las siete cepas de *E. coli* a las concentraciones probadas (CMI > 32.000 mg/L) e incluso lo estimuló de manera significativa a partir de 2.000 mg/L para todas las cepas, IBU no disminuyó ni aumentó el crecimiento (CMI > 125 mg/L) y NAC inhibió el crecimiento de todas las cepas a 2.000 mg/L (CMI = 2.000 mg/L).

#### **4.4.1.2 Sobre la formación de biopelícula**

Para excluir descenso en la formación de biopelícula debido a inhibición del crecimiento bacteriano, todos los compuestos se utilizaron a concentraciones subinhibitorias.

En la figura 13 se muestran los efectos de diferentes concentraciones de los compuestos sobre la formación de biopelícula por las siete cepas clasificadas como formadoras fuertes así como la CMIB de cada compuesto.



\* Concentración Mínima Inhibitoria de Biopelícula (CMIB),  $p \leq 0,01$

**Figura 13.** Porcentaje de FEB en presencia de diferentes concentraciones (mg/L) de albúmina sérica humana (HSA), ibuprofeno (IBU) y N-acetil-L-cisteína (NAC) respecto a pocillos control sin compuestos.

Pese a su efecto estimulador del crecimiento, HSA se mostró como el compuesto más eficaz en la inhibición de la formación de biopelícula. Disminuciones significativas fueron observadas a partir de la concentración más baja estudiada (CMIB = 8 mg/L) para todas las cepas, variando del 44,9% al 79,4%, mientras que la presencia de la concentración más alta (32.000 mg/L) provocó drásticas reducciones en la formación de biopelícula, variando del 92,6% al 99,7%. Considerando las concentraciones intermedias (125 y 2.000 mg/L) se observaron reducciones no concentración dependiente para cuatro cepas (Ec1, Ec9180, Ec9182 y EcATCC).

IBU redujo la biopelícula significativamente en cinco de las siete cepas, con CMIB desde 2 mg/L hasta 125 mg/L, observándose disminuciones más intensas a 125 mg/L (37,2% – 44,8%).

NAC también disminuyó significativamente la formación de la biopelícula en cinco cepas con CMIB entre 30 y 125 mg/L (19,6% – 39,7%).

Ninguno de los compuestos aumentó la formación de biopelícula por las cepas estudiadas.

#### **4.4.2 Efectos del tratamiento previo del material abiótico con los compuestos**

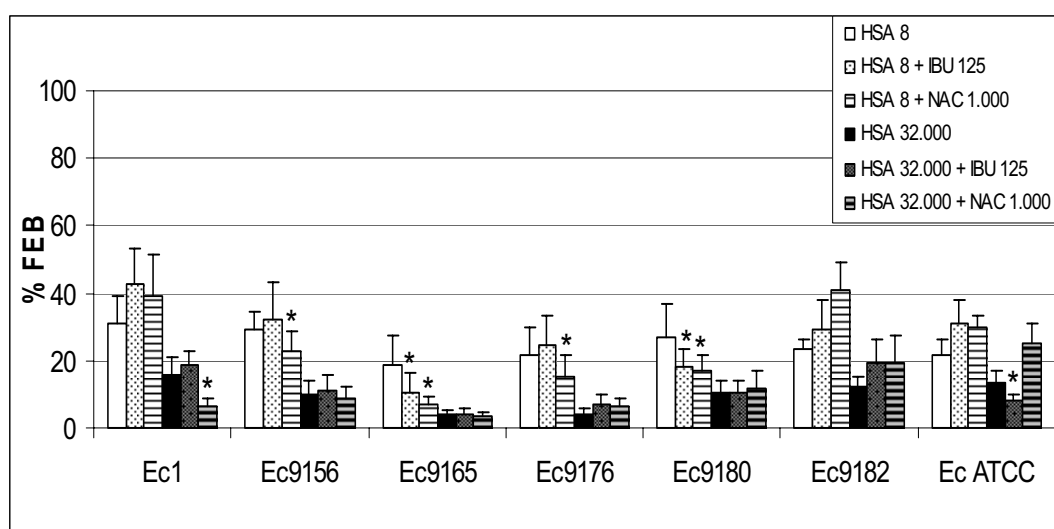
##### **4.4.2.1 Sobre el crecimiento bacteriano**

Por lo general, el crecimiento de las cepas no se vio afectado por los tratamientos previos de los pocillos con los compuestos y asociaciones, exceptuando las cepas Ec9165 y Ec9176. La cepa Ec9165 mostró un aumento

significativo con HSA 32.000 mg/L (sola o asociada a IBU o NAC) y con HSA 8 mg/L (sola o combinada con NAC) y la cepa Ec9176 con HSA 32.000 mg/L (sola o asociada a IBU) y HSA 8 mg/L sola.

#### 4.4.2.2 Sobre la formación de biopelícula

En la figura 14 se recogen los efectos del tratamiento previo de los pocillos con los compuestos y asociaciones en la formación de biopelícula por las siete cepas de *E. coli*. IBU 125 mg/L y NAC 1.000 mg/L solos no redujeron significativamente la formación de biopelícula en cepa alguna, por lo que no están representados en la figura.



\* Inhibición significativamente mayor de FEB por HSA combinada con IBU o NAC comparada con HSA sola a la misma concentración, ( $p \leq 0,01$ )

**Figura 14.** Porcentaje de FEB en los pocillos tratados previamente con dos concentraciones (mg/L) de HSA y sus asociaciones con IBU o NAC respecto a los pocillos control no tratados

Ambas concentraciones de HSA fueron capaces de reducir significativamente la formación de biopelícula por todas cepas, variando estas reducciones del 69,1 al 81,5% con 8 mg/L, y del 84 al 96,1% con 32.000 mg/L.

También se observaron reducciones en la formación de biopelículas cuando se asoció 8 mg/L de HSA con IBU (125 mg/L) y con NAC (1.000 mg/L) oscilando entre 57,5 y 89,6% y entre 59,1 y 92,8%, respectivamente. Para los mismos compuestos combinados con 32.000 mg/L de HSA la disminución fue de 80,6 – 95,8% y 74,7 – 96,6%, respectivamente.

El impacto de las combinaciones de HSA con IBU o NAC respecto a HSA sola fue dependiente de la concentración de albúmina y de la cepa. Las combinaciones entre HSA (8 o 32.000 mg/L) con 125 mg/L de IBU disminuyeron de manera significativa la formación de biopelícula para las cepas Ec9165 y Ec9180 (HSA 8 mg/L) y EcATCC (32.000 mg/L), en comparación con el efecto de HSA sola. La asociación de NAC a 1.000 mg/L con HSA a 8 mg/L produjo reducciones significativas en las cepas Ec9156, EC9165, Ec9176 y Ec9180 mientras que con 32.000 mg/L de HSA sólo redujo significativamente para la cepa Ec1.

Para las otras situaciones (combinaciones y/o cepas) no se observaron diferencias significativas entre las reducciones de la formación de biopelícula proporcionadas por las asociaciones respecto a las reducciones debidas a HSA sola.



## 4.5 ACTIVIDAD DE ANTIMICROBIANOS FRENTE A BACTERIAS PLANCTÓNICAS Y ASOCIADAS A BIOPELÍCULA

### 4.5.1 Sensibilidad de las cepas a los antimicrobianos

En la tabla 17 se recoge la CMI de los antimicrobianos estudiados, frente a las 15 cepas de *E. coli* por la técnica de microdilución en caldo.

**Tabla 17.** CMI (mg/L) de cinco antimicrobianos frente a 15 cepas de *E. coli*.

| Cepas  | Antimicrobianos |       |       |       |         |
|--------|-----------------|-------|-------|-------|---------|
|        | AMX             | AMC   | CTX   | GEN   | CIP     |
| Ec1    | 4               | 4/2   | 0,25  | 1     | ≤ 0,015 |
| Ec2    | ≥ 1024          | 8/4   | 0,12  | 1     | 8       |
| Ec3    | ≥ 1024          | 16/8  | ≥ 256 | 64    | ≥ 16    |
| Ec9152 | 4               | 4/2   | 0,12  | 1     | 1       |
| Ec9153 | 8               | 4/2   | 0,06  | ≤ 0,5 | ≤ 0,015 |
| Ec9154 | 512             | 8/4   | 0,12  | 64    | 8       |
| Ec9156 | 256             | 32/16 | 4     | 0,5   | ≤ 0,015 |
| Ec9165 | 4               | 4/2   | 0,12  | 1     | ≤ 0,015 |
| Ec9173 | 4               | 4/2   | 0,12  | 1     | ≤ 0,015 |
| Ec9175 | 256             | 16/8  | 0,5   | ≤ 0,5 | ≤ 0,015 |
| Ec9176 | ≥ 1024          | 16/8  | 0,12  | 1     | ≤ 0,015 |
| Ec9180 | 4               | 2/1   | 0,12  | 1     | ≤ 0,015 |
| Ec9182 | 4               | 2/1   | 0,12  | 1     | ≤ 0,015 |
| Ec9192 | 8               | 4/2   | 0,25  | 1     | ≤ 0,015 |
| EcATCC | 8               | 8/4   | 0,12  | 1     | ≤ 0,015 |

En la tabla 18 se muestra la correlación entre la categoría de formación específica de biopelícula y la sensibilidad a los antimicrobianos de las cepas de *E. coli*.

**Tabla 18.** Categorías de las cepas de *E. coli* atendiendo a su capacidad para formación de biopelícula y la sensibilidad a los antimicrobianos.

| Cepas         | Categoría | Antimicrobianos |     |     |     |     |
|---------------|-----------|-----------------|-----|-----|-----|-----|
|               |           | AMX             | AMC | CTX | GEN | CIP |
| <b>Ec1</b>    | Fuerte    | S               | S   | S   | S   | S   |
| <b>Ec2</b>    | Débil     | R               | S   | S   | S   | R   |
| <b>Ec3</b>    | Débil     | R               | I   | R   | R   | R   |
| <b>Ec9152</b> | Débil     | S               | S   | S   | S   | S   |
| <b>Ec9153</b> | Débil     | S               | S   | S   | S   | S   |
| <b>Ec9154</b> | Débil     | R               | S   | S   | R   | R   |
| <b>Ec9156</b> | Fuerte    | R               | R   | S   | S   | S   |
| <b>Ec9165</b> | Fuerte    | S               | S   | S   | S   | S   |
| <b>Ec9173</b> | Débil     | S               | S   | S   | S   | S   |
| <b>Ec9175</b> | Débil     | R               | I   | S   | S   | S   |
| <b>Ec9176</b> | Fuerte    | R               | I   | S   | S   | S   |
| <b>Ec9180</b> | Fuerte    | S               | S   | S   | S   | S   |
| <b>Ec9182</b> | Fuerte    | S               | S   | S   | S   | S   |
| <b>Ec9192</b> | Débil     | S               | S   | S   | S   | S   |
| <b>EcATCC</b> | Fuerte    | S               | S   | S   | S   | S   |

S: sensible; I: sensibilidad intermedia; R: resistente

De las 15 cepas estudiadas, seis (40%) fueron resistentes a amoxicilina, una (6,7%) a amoxicilina / ácido clavulánico, otra (6,7%) a cefotaxima, dos (13,3%) a gentamicina y tres (20%) a ciprofloxacina. Tres cepas (20%) mostraron sensibilidad intermedia a amoxicilina / ácido clavulánico.

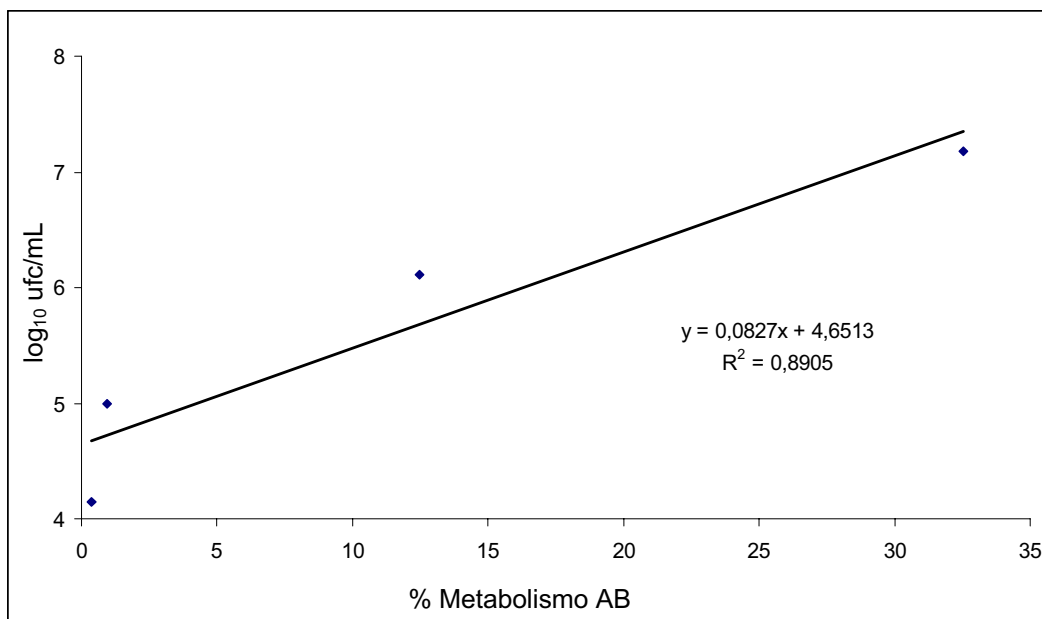
En general, las cepas identificadas como formadoras débiles de biopelícula fueron más resistentes a los antimicrobianos estudiados. Todas las cepas de *E. coli* formadoras fuertes de biopelículas fueron sensibles a cefotaxima, gentamicina y ciprofloxacina. Resistencia concomitante a tres o más antimicrobianos no fue observada en ninguna de estas cepas, sin embargo, fue detectada en 2 de las 8 cepas (25%) formadoras débiles de biopelículas, aunque ninguna de las diferencias entre los dos grupos fue estadísticamente significativa.

#### 4.5.2 Sensibilidad de las bacterias planctónicas y asociadas a biopelícula a los antimicrobianos determinada por el método del Azul de Alamar

##### 4.5.2.1 Correlación entre el metabolismo del Azul de Alamar y recuentos bacterianos

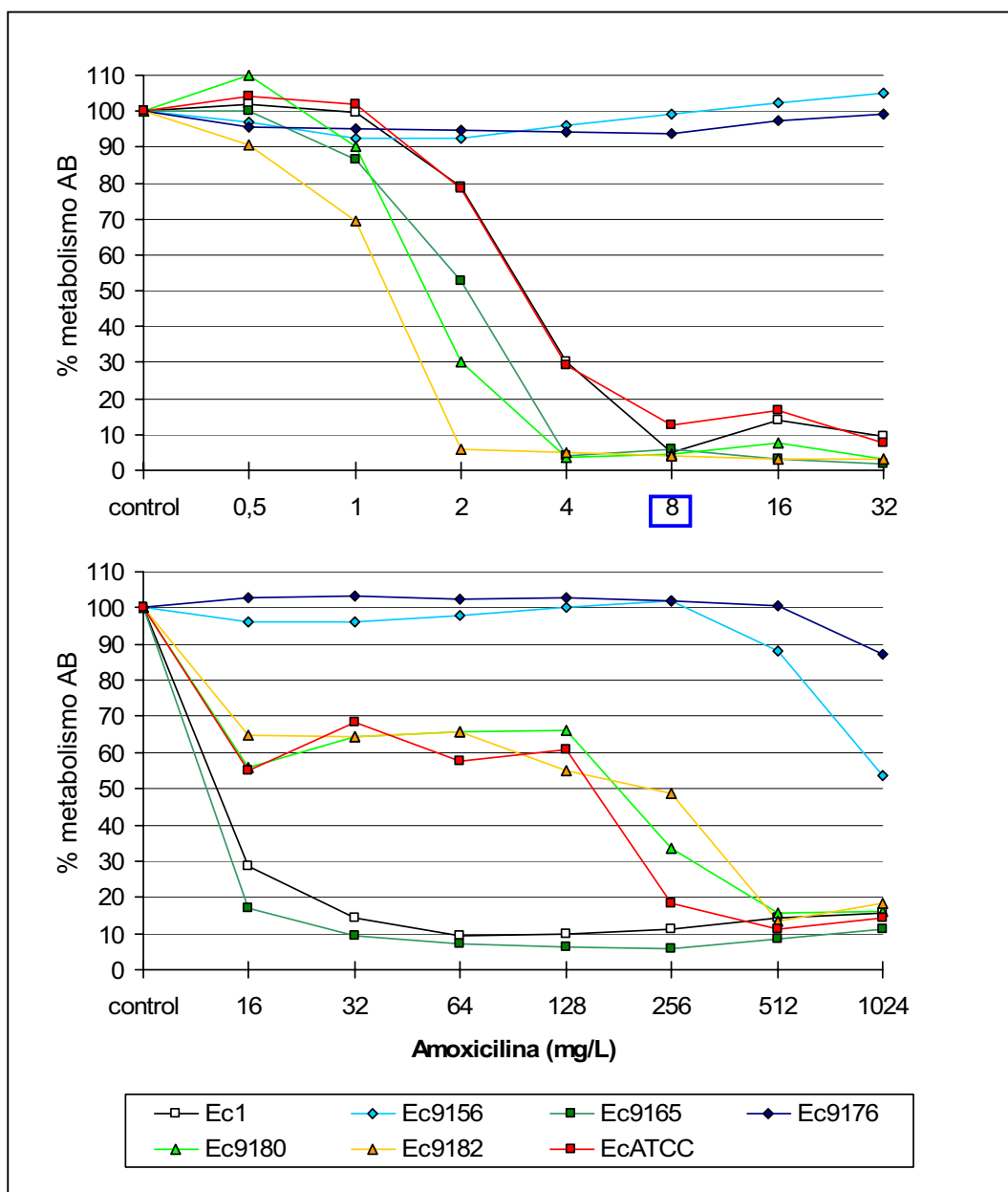
En la figura 15 se muestra la correlación entre el porcentaje de reducción metabólica del AB y los recuentos bacterianos ( $\log_{10}$  ufc/mL) de la cepa EcATCC. Existió una buena correlación ( $R^2 = 0,8905$ ) entre el porcentaje del metabolismo del AB y el número de bacterias viables.

**Figura 15.** Correlación entre el porcentaje de metabolismo del Azul de Alamar y los recuentos ( $\log_{10}$  ufc/mL) de la cepa EcATCC.



#### 4.5.2.2 Efectos de los antimicrobianos en bacterias planctónicas y asociadas a biopelícula por el método del Azul de Alamar

En las figuras 16 a 20 se muestran los impactos de diversas concentraciones de los antimicrobianos evaluados frente a bacterias planctónicas (panel superior) y asociadas a biopelícula (panel inferior). Los resultados son expresados como porcentaje del metabolismo del AB respecto a los controles.

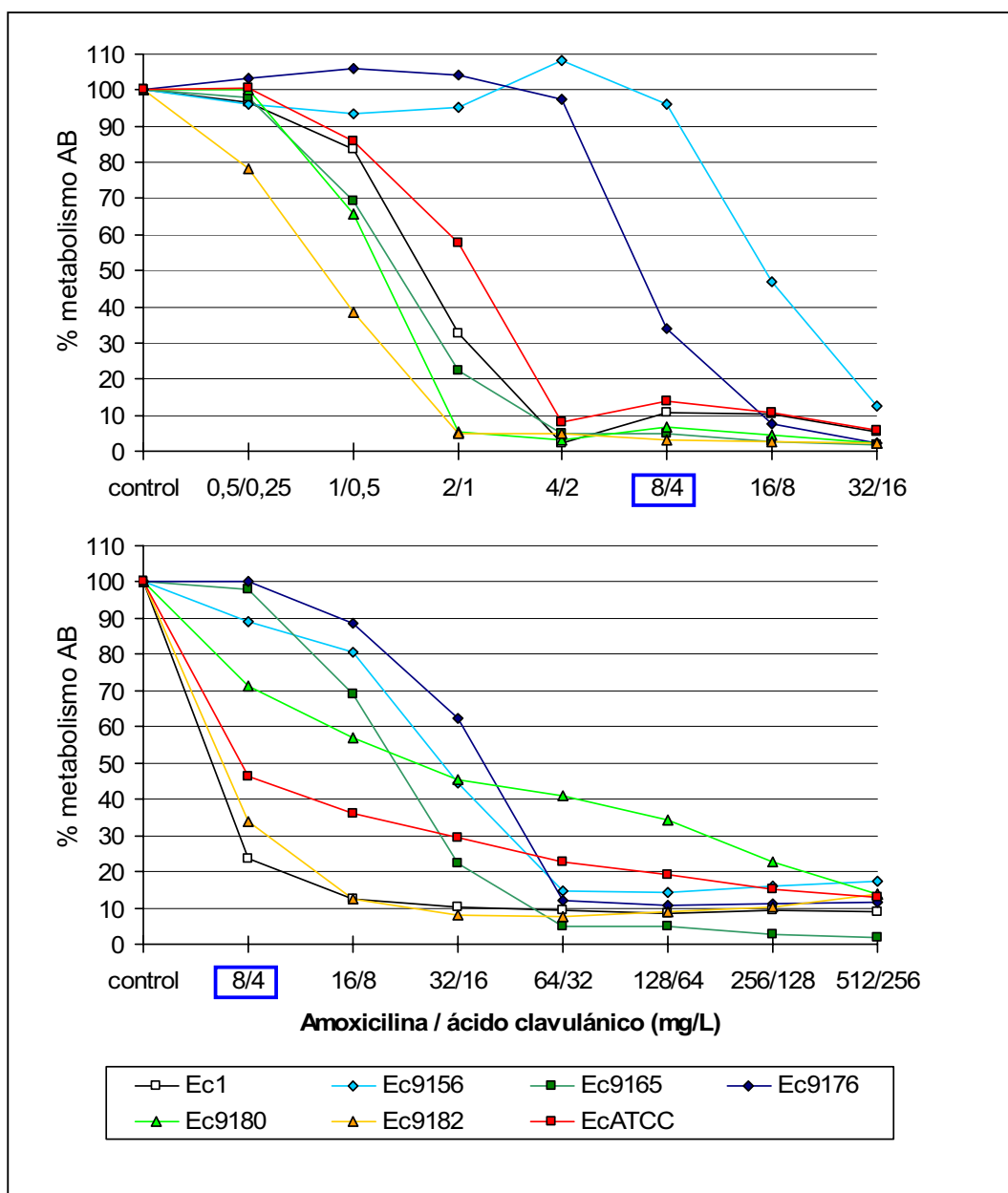


Cuadro azul: Punto de corte de sensibilidad al antimicrobiano (CLSI, 2006)

**Figura 16.** Impacto de diferentes concentraciones de amoxicilina sobre bacterias planctónicas (panel superior) y asociadas a biopelícula (panel inferior).

En el estudio de sensibilidad de las bacterias planctónicas a amoxicilina por el método del AB dos cepas (Ec9156 y Ec9176) no fueron inhibidas de manera significativa por las concentraciones utilizadas, las demás mostraron reducciones del metabolismo del AB ( $\geq 80\%$ ) a concentraciones de 2 mg/L (Ec9182), 4 mg/L (Ec9165 y Ec9180) y 8 mg/L (Ec1 y EcATCC).

Respecto a la sensibilidad de las bacterias asociadas a biopelícula, las concentraciones mínimas de amoxicilina necesarias para inhibir el 80% del metabolismo del AB de las cinco cepas sensibles fueron 16 mg/L (Ec9165), 32 mg/L (Ec1), 256 mg/L (EcATCC) y 512 mg/L (Ec9180 y Ec9182).



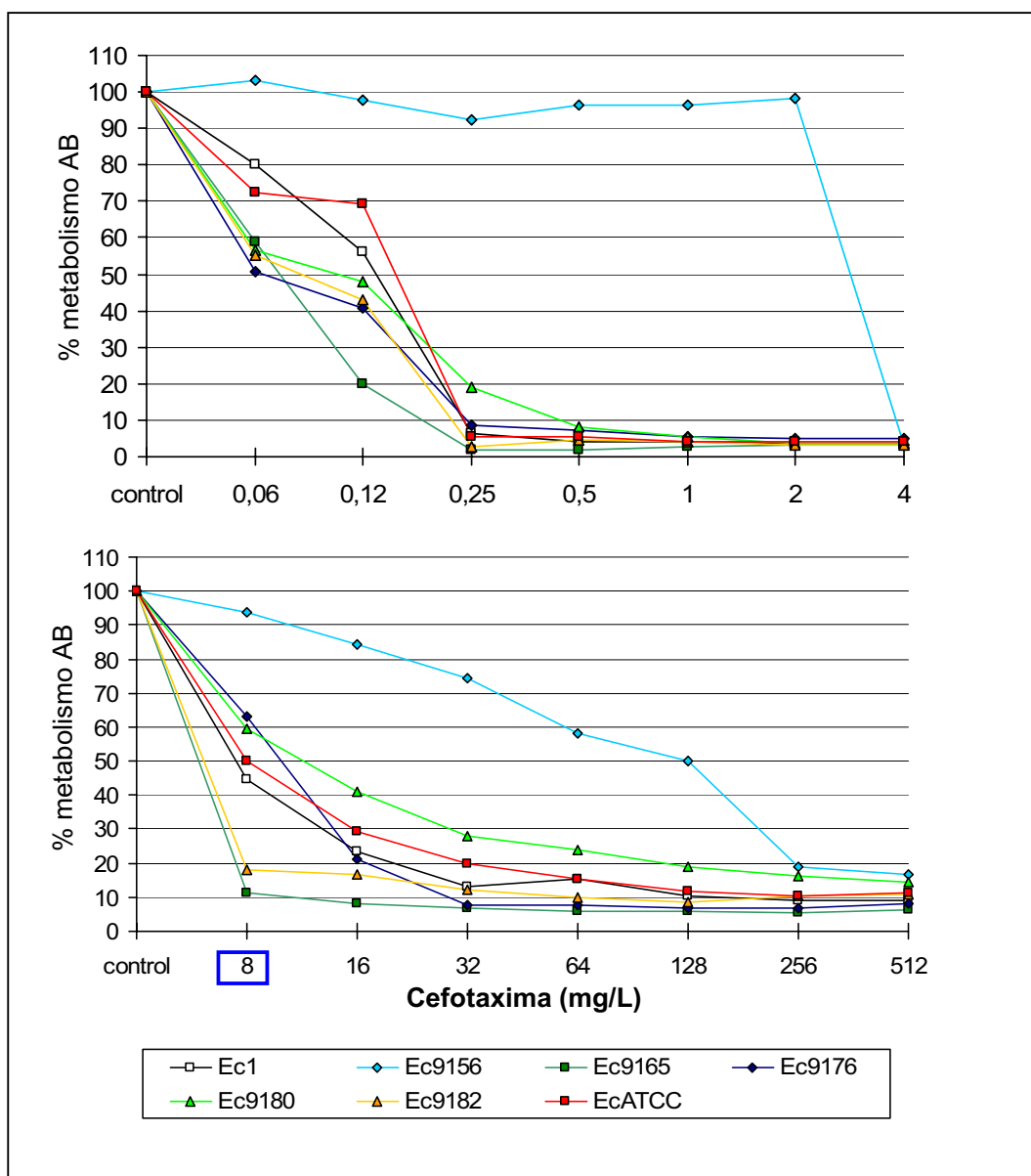
Cuadro azul: Punto de corte de sensibilidad al antimicrobiano (CLSI, 2006)

**Figura 17.** Impacto de diferentes concentraciones de amoxicilina / ácido clavulánico sobre bacterias planctónicas (panel superior) y asociadas a biopelícula (panel inferior).

En el estudio de sensibilidad de las bacterias planctónicas a amoxicilina / ácido clavulánico, la inhibición del 80% del metabolismo del AB se consiguió con 2/1 mg/L (Ec9180 y Ec9182) y 4/2 mg/L (Ec1, Ec9165 y EcATCC). La cepa Ec9176 que presentaba sensibilidad intermedia necesitó de 16/8 mg/L para alcanzar el mismo grado de inhibición del metabolismo del AB y la cepa resistente (Ec9156), 32/16 mg/L.

Respecto a las bacterias asociadas a biopelícula, la inhibición del 80% del metabolismo del AB por amoxicilina / ácido clavulánico fue observada en dos cepas con 16/8 mg/L (Ec1 y Ec9182), en tres con 64/32 mg/L (Ec9156, Ec9165 y Ec9176), en una con 128/64 mg/L (EcATCC) y en otra con 512/256 mg/L (Ec9180).



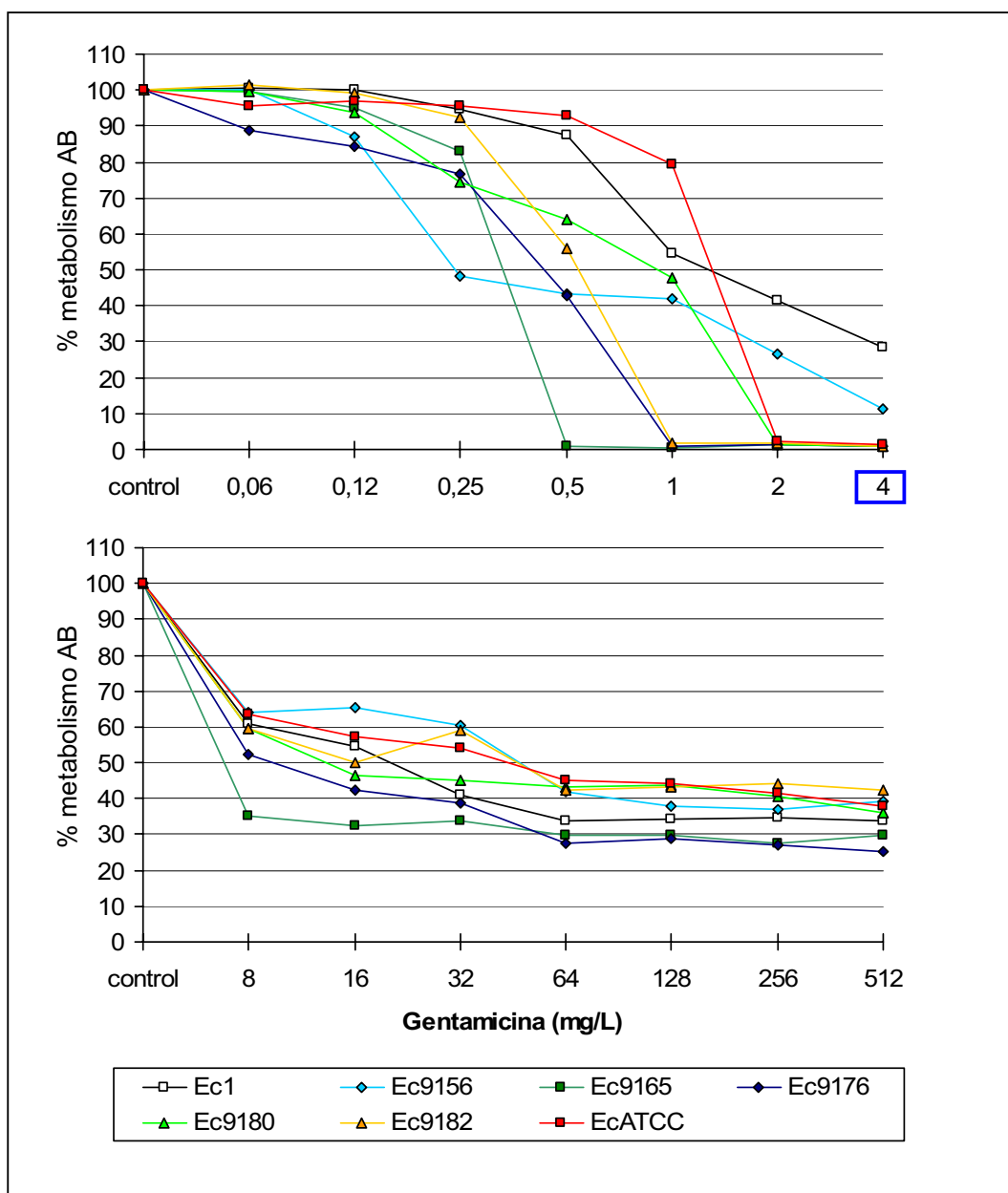


Cuadro azul: Punto de corte de sensibilidad al antimicrobiano (CLSI, 2006)

**Figura 18.** Impacto de diferentes concentraciones de cefotaxima sobre bacterias planctónicas (panel superior) y asociadas a biopelícula (panel inferior).

Con cefotaxima se observaron inhibiciones del 80% del metabolismo del AB en las bacterias planctónicas con 0,12 mg/L (Ec9165), 0,25 mg/L (Ec1, Ec9176, Ec9180, Ec9182 y EcATCC) y 4 mg/L (Ec9156).

En las bacterias asociadas a biopelícula, cefotaxima inhibió el 80% del metabolismo del AB en dos cepas con 8 mg/L (Ec9165 y Ec9182), en otras tres cepas con 32 mg/L (Ec1, Ec9176 y EcATCC), en una con 128 mg/L (Ec9180) y en la restante necesitó 256 mg/L (Ec9156).

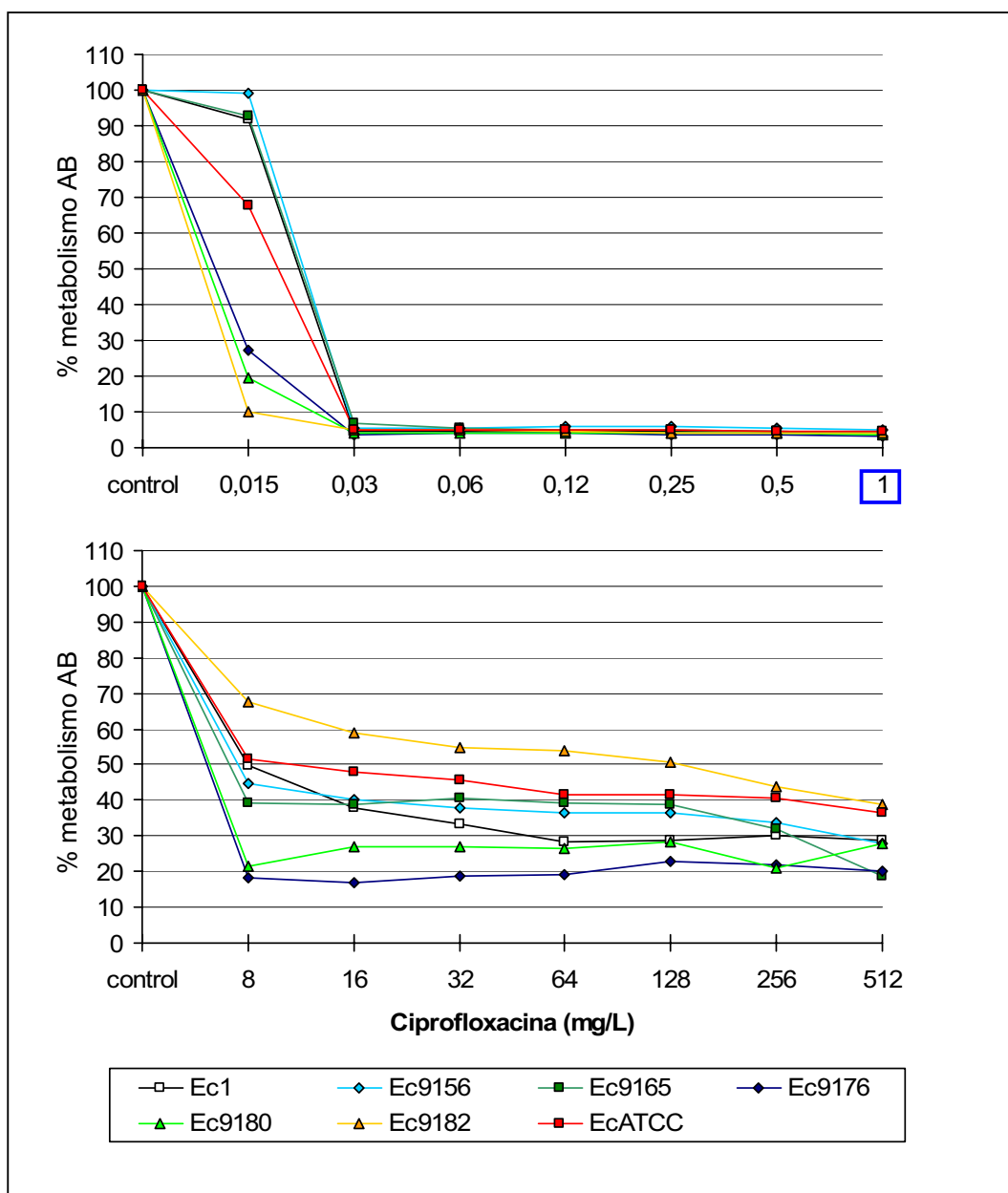


Cuadro azul: Punto de corte de sensibilidad al antimicrobiano (CLSI, 2006)

**Figura 19.** Impacto de diferentes concentraciones de gentamicina sobre bacterias planctónicas (panel superior) y asociadas a biopelícula (panel inferior).

Para inhibir el 80% del metabolismo del AB de las bacterias planctónicas con gentamicina fueron necesarias concentraciones de 0,5 mg/L (Ec9165), 1 mg/L (Ec9176 y Ec9182), 2 mg/L (Ec9180 y EcATCC) y 4 mg/L (Ec9156). La cepa Ec1 no fue inhibida en el mismo grado por ninguna de las concentraciones ensayadas.

En ninguna de las siete cepas se detectó inhibición del 80% del metabolismo del AB por gentamicina cuando las bacterias estaban asociadas a biopelícula incluso con la concentración de 512 mg/L.



Cuadro azul: Punto de corte de sensibilidad al antimicrobiano (CLSI, 2006)

**Figura 20.** Impacto de diferentes concentraciones de ciprofloxacin sobre bacterias planctónicas (panel superior) y asociadas a biopelícula (panel inferior).

Ciprofloxacina a concentraciones  $\leq 0,03$  mg/L inhibió el 80% del metabolismo del AB en las siete cepas cuando crecían como bacterias planctónicas.

En las bacterias asociadas a biopelícula ciprofloxacina solo fue capaz de inhibir el 80% del metabolismo del AB en dos cepas (Ec9176 y Ec9180) con la concentración de 8 mg/L, con 512 mg/L para una cepa (Ec9165) y para las demás no se alcanzó con las concentraciones ensayadas.

En las tablas 19 y 20 se recoge la sensibilidad de las bacterias planctónicas (CMI-AB<sub>50</sub> y CMI-AB<sub>80</sub>) y asociadas a biopelículas (CMIB-AB<sub>50</sub> y CMIB-AB<sub>80</sub>) por el método del AB para las siete cepas de *E. coli* estudiadas.

**Tabla 19.** CMI-AB<sub>50</sub> y CMI-AB<sub>80</sub> (mg/L) de cinco antimicrobianos frente a las bacterias planctónicas de las cepas de *E. coli* formadoras fuertes de biopelícula.

| Cepas         | Antimicrobiano       |                      |                      |                      |                      |                      |                      |                      |                      |                      |
|---------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
|               | AMX                  |                      | AMC                  |                      | CTX                  |                      | GEN                  |                      | CIP                  |                      |
|               | CMI-AB <sub>50</sub> | CMI-AB <sub>80</sub> | CMI-AB <sub>50</sub> | CMI-AB <sub>80</sub> | CMI-AB <sub>50</sub> | CMI-AB <sub>80</sub> | CMI-AB <sub>50</sub> | CMI-AB <sub>80</sub> | CMI-AB <sub>50</sub> | CMI-AB <sub>80</sub> |
| <b>Ec1</b>    | 4                    | 8                    | 2/1                  | 4/2                  | 0,25                 | 0,25                 | 2                    | 4                    | 0,03                 | 0,03                 |
| <b>Ec9156</b> | 256                  | 256                  | 16/8                 | 32/16                | 4                    | 4                    | 0,25                 | 4                    | 0,03                 | 0,03                 |
| <b>Ec9165</b> | 4                    | 4                    | 2/1                  | 4/2                  | 0,12                 | 0,12                 | 0,5                  | 0,5                  | 0,03                 | 0,03                 |
| <b>Ec9176</b> | $\geq 1024$          | $\geq 1024$          | 8/4                  | 16/8                 | 0,12                 | 0,25                 | 0,5                  | 1                    | 0,015                | 0,03                 |
| <b>Ec9180</b> | 2                    | 4                    | 2/1                  | 2/1                  | 0,12                 | 0,25                 | 1                    | 2                    | 0,015                | 0,015                |
| <b>Ec9182</b> | 2                    | 2                    | 1/0,5                | 2/1                  | 0,12                 | 0,25                 | 1                    | 2                    | 0,015                | 0,015                |
| <b>EcATCC</b> | 4                    | 4                    | 4/2                  | 8/4                  | 0,25                 | 0,25                 | 2                    | 2                    | 0,03                 | 0,03                 |

Comparando las CMI-AB<sub>50</sub> y CMI-AB<sub>80</sub> obtenidas para cada cepa y antimicrobiano encontramos que los valores fueron iguales o mostraron una dilución de diferencia para todos los antimicrobianos, con la excepción de la

CMI-AB<sub>80</sub> de gentamicina para la cepa Ec9156 que fue ocho veces más alta que la CMI-AB<sub>50</sub>.

Además, si se comparan las CMIs determinadas por el método de microdilución preconizado por el CLSI (tabla 17) con las CMIs obtenidas por el método de AB para las bacterias planctónicas (tabla 19) se comprueba que los valores son iguales o difieren en una dilución.

En la tabla 20 se recopilan las CMIB-AB<sub>50</sub> y CMIB-AB<sub>80</sub> de los antimicrobianos frente a las bacterias asociadas a biopelícula por el método de AB de las siete cepas de *E. coli* estudiadas.

**Tabla 20.** CMIB-AB<sub>50</sub> y CMIB-AB<sub>80</sub> (mg/L) de cinco antimicrobianos frente a las bacterias asociadas a biopelícula de las cepas de *E. coli* formadoras fuertes.

| Cepas         | Antimicrobianos       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |
|---------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
|               | AMX                   |                       | AMC                   |                       | CTX                   |                       | GEN                   |                       | CIP                   |                       |
|               | CMIB-AB <sub>50</sub> | CMIB-AB <sub>80</sub> | CMIB-AB <sub>50</sub> | CMIB-AB <sub>80</sub> | CMIB-AB <sub>50</sub> | CMIB-AB <sub>80</sub> | CMIB-AB <sub>50</sub> | CMIB-AB <sub>80</sub> | CMIB-AB <sub>50</sub> | CMIB-AB <sub>80</sub> |
| <b>Ec1</b>    | 16                    | 32                    | 8/4                   | 16/8                  | 8                     | 32                    | 32                    | ≥ 1024                | 8                     | ≥ 1024                |
| <b>Ec9156</b> | 256                   | 256                   | 32/16                 | 64/32                 | 128                   | 256                   | 64                    | ≥ 1024                | 8                     | ≥ 1024                |
| <b>Ec9165</b> | 16                    | 16                    | 32/16                 | 64/32                 | 4                     | 8                     | 4                     | ≥ 1024                | 0,25                  | 16                    |
| <b>Ec9176</b> | ≥ 1024                | ≥ 1024                | 64/32                 | 64/32                 | 16                    | 16                    | 16                    | ≥ 1024                | 0,5                   | 8                     |
| <b>Ec9180</b> | 256                   | 512                   | 32/16                 | 512/256               | 16                    | 128                   | 16                    | ≥ 1024                | 0,25                  | 8                     |
| <b>Ec9182</b> | 256                   | 512                   | 8/4                   | 16/8                  | 4                     | 8                     | 16                    | ≥ 1024                | 128                   | ≥ 1024                |
| <b>EcATCC</b> | 256                   | 256                   | 8/4                   | 128/64                | 8                     | 32                    | 64                    | ≥ 1024                | 16                    | ≥ 1024                |

En la comparación entre las CMIB-AB<sub>50</sub> y CMIB-AB<sub>80</sub> de amoxicilina para cada cepa, se verifica que los valores fueron iguales o exhibieron una dilución de diferencia. Lo mismo fue observado para amoxicilina / ácido clavulánico, exceptuando para las cepas Ec9180 y EcATCC las cuales presentaron CMIB-AB<sub>80</sub> 16 veces más altas que las CMIB-AB<sub>50</sub>.

Con cefotaxima se observaron diferencias significativas para la cepa Ec9180, con CMIB-AB<sub>80</sub> ocho veces más alta que la CMIB-AB<sub>50</sub> y para las

cepas Ec1 y EcATCC que necesitaron concentraciones cuatro veces más altas. Para las demás cepas los valores de CMIB-AB<sub>50</sub> y CMIB-AB<sub>80</sub> de cefotaxima fueron iguales o exhibieron una dilución de diferencia.

Gentamicina necesitó concentraciones mucho más altas para alcanzar las CMIB-AB<sub>80</sub> en comparación con las CMIB-AB<sub>50</sub> para todas las cepas. Las diferencias fueron de al menos 16 veces para Ec9156 y EcATCC, de al menos 32 veces para Ec1, de al menos 64 veces para Ec9176, Ec9180 y Ec9182, y de al menos 256 veces para Ec9165.

Los valores de CMIB-AB<sub>80</sub> fueron superiores a los de CMIB-AB<sub>50</sub> de ciprofloxacina frente a todas las cepas. Las diferencias fueron de al menos ocho veces para la cepa Ec9182, de 16 veces para la cepa Ec9176, de 32 veces para Ec9180, de 64 veces para Ec9165 y EcATCC, y de al menos 128 veces para Ec1 y Ec9156.

#### 4.5.2.3 Comparación de la actividad de los antimicrobianos frente a bacterias asociadas a biopelículas y planctónicas

En la tabla 21 se presentan los cocientes que expresan las diferencias entre las CMIBs-AB y las CMIs-AB para las bacterias asociadas a biopelícula y planctónicas, respectivamente.



**Tabla 21.** Cociente entre CMIBs-AB (bacterias asociadas a biopelículas) y CMI (bacterias planctónicas) obtenidas con 5 antibióticos utilizando valores del 50 y 80% de inhibición.

| Antimicrobiano                               | Cepa    |         |        |        |        |         |         |
|--|---------|---------|--------|--------|--------|---------|---------|
|  | Ec1     | Ec9156  | Ec9165 | Ec9176 | Ec9180 | Ec9182  | EcATCC  |
| <b>AMX</b>                                   |         |         |        |        |        |         |         |
| CMIB-AB <sub>50</sub> / CMI-AB <sub>50</sub> | 4       | -       | 4      | -      | 128    | 128     | 64      |
| CMIB-AB <sub>80</sub> / CMI-AB <sub>80</sub> | 4       | -       | 4      | -      | 128    | 256     | 64      |
| <b>AMC</b>                                   |         |         |        |        |        |         |         |
| CMIB-AB <sub>50</sub> / CMI-AB <sub>50</sub> | 4       | 2       | 16     | 8      | 16     | 8       | 2       |
| CMIB-AB <sub>80</sub> / CMI-AB <sub>80</sub> | 4       | 2       | 16     | 4      | 256    | 64      | 32      |
| <b>CTX</b>                                   |         |         |        |        |        |         |         |
| CMIB-AB <sub>50</sub> / CMI-AB <sub>50</sub> | 32      | 32      | 33,4   | 133,4  | 133,4  | 33,4    | 32      |
| CMIB-AB <sub>80</sub> / CMI-AB <sub>80</sub> | 128     | 64      | 66,7   | 64     | 512    | 32      | 64      |
| <b>GEN</b>                                   |         |         |        |        |        |         |         |
| CMIB-AB <sub>50</sub> / CMI-AB <sub>50</sub> | 16      | 128     | 8      | 32     | 16     | 16      | 32      |
| CMIB-AB <sub>80</sub> / CMI-AB <sub>80</sub> | ≥ 256   | ≥ 2048  | ≥ 2048 | ≥ 1024 | ≥ 512  | ≥ 1024  | ≥ 512   |
| <b>CIP</b>                                   |         |         |        |        |        |         |         |
| CMIB-AB <sub>50</sub> / CMI-AB <sub>50</sub> | 267     | 267     | 8,3    | 33,4   | 16,7   | 8533,4  | 533,4   |
| CMIB-AB <sub>80</sub> / CMI-AB <sub>80</sub> | ≥ 34000 | ≥ 34000 | 533    | 266    | > 533  | ≥ 68000 | ≥ 34000 |

Las diferencias entre CMIB-AB<sub>50</sub> y CMI-AB<sub>50</sub> para amoxicilina oscilaron entre 4 y 128 veces, concretamente para las cepas Ec9180 y Ec9182 se necesitaron concentraciones 128 veces más elevadas para inhibir las bacterias asociadas a biopelículas comparadas a las planctónicas. Cuando fue considerada la diferencia entre CMIB-AB<sub>80</sub> y CMI-AB<sub>80</sub> la diferencia fue de 4 a 256 veces más alta.

Para amoxicilina / ácido clavulánico las diferencias fueron de 2 a 16 veces entre CMIB-AB<sub>50</sub> y CMI-AB<sub>50</sub> y de 2 a 256 veces entre CMIB-AB<sub>80</sub> y CMI-AB<sub>80</sub>. Cefotaxima presentó diferencias de 32 a 133 veces considerando CMIB-AB<sub>50</sub> y CMI-AB<sub>50</sub> y de 32 a 512 veces para CMIB-AB<sub>80</sub> y CMI-AB<sub>80</sub>.

Para gentamicina se necesitaron concentraciones desde ≥ 256 a ≥ 2048 veces para obtener CMIB-AB<sub>80</sub> comparada con CMI-AB<sub>80</sub>, considerando las

diferencias entre CMIB-AB<sub>50</sub> y CMI-AB<sub>50</sub>, estas no fueron tan drásticas (8 a 128 veces).

Las mayores diferencias fueron observadas para ciprofloxacina que necesitó concentraciones mucho más altas para inhibir las bacterias asociadas a biopelícula comparadas a las planctónicas, entre 8 y 8533 veces (CMIB-AB<sub>50</sub> y CMI-AB<sub>50</sub>) y entre 266 a  $\geq 68000$  (CMIB-AB<sub>80</sub> y CMI-AB<sub>80</sub>).

Las concentraciones de los antimicrobianos necesarias para inhibir el crecimiento de las bacterias asociadas a biopelícula fueron superiores a las inhibitorias de las bacterias planctónicas en las siete cepas de *E. coli* estudiadas.



## 5. DISCUSIÓN

La evaluación de diferentes métodos de estudio de la capacidad de formación de biopelícula por cuatro cepas de *E. coli* en condiciones estáticas *in vitro* mostraron resultados muy variables dependiendo de la cepa en sí, del caldo de cultivo, de la metodología de incubación y de las fórmulas matemáticas utilizadas en la cuantificación de la biopelícula.

En la mayoría de los estudios, la formación de biopelículas por diferentes especies de microorganismos es estimada por las DOs obtenidas después de la tinción de las bacterias adheridas con CV u otros colorantes que indican la biomasa total. El CV es un colorante básico que se une a moléculas superficiales cargadas negativamente y a polisacáridos en la matriz celular, además de células viables y no viables (Peeters et al., 2008). Esa técnica fue descrita por Christensen et al. (1985) para estafilococos y desde entonces ha sido modificada de diferentes maneras para aumentar su sensibilidad. Las principales ventajas de ese método son su facilidad de ejecución, la reproducibilidad y el bajo coste. Sus desventajas residen en el hecho de que no permite la diferenciación entre células viables y no viables, y que células de distintas especies de microorganismos pueden ser teñidas con intensidades diferentes lo que podría interferir en la comparación entre ellos (Narisawa et al., 2005; Peeters et al., 2008).

El tratamiento de las DOs obtenidas con diferentes fórmulas matemáticas es un importante factor en el diseño del experimento ya que en nuestro estudio se demostraron discordancias superiores al 30% en la clasificación de la capacidad de formación de biopelícula entre las tres formulas utilizadas.

En este estudio consideramos que la fórmula que permite obtener el índice FEB era la más adecuada una vez que contemplaba todas las variables del sistema: los valores de las DOs de las bacterias adheridas y teñidas, de los pocillos control no inoculados que consideraban los factores inespecíficos como tinción del material abiótico o precipitaciones del colorante y las DOs alcanzadas por el crecimiento bacteriano.

Otra variable estudiada fue la utilización de protocolos con una o dos etapas de incubación. Algunos autores han descrito la utilización de una única etapa de incubación mientras que otros realizan subcultivos en una segunda placa microtiter considerando solo los resultados de la última (Danese et al., 2000; Soto et al., 2007). En nuestro estudio diferencias significativas fueron encontradas entre los dos protocolos de incubación, sobre todo considerando la clasificación de las cepas por el índice FEB, por lo que en el diseño de experimentos de formación de biopelícula por *E. coli* se debería tener en cuenta esta variable como significativa.

La cantidad de biopelícula fue sensiblemente mayor en los medios mínimos, lo que está de acuerdo con estudios publicados anteriormente mostrando que tanto la adherencia bacteriana como la formación de biopelícula son estimuladas en condiciones de escasez de nutrientes en el medio (Yang et al., 2004; Reisner et al., 2006; Skyberg et al., 2006). Sin embargo este aspecto

también está controvertido y otros autores han descrito una intensa formación de biopelículas por *E. coli* en caldo LB y una baja formación en caldos mínimos suplementados con una única fuente de carbono como glucosa o glicerol y desprovisto de casamino ácidos (Pratt y Kolter, 1998) sugiriendo que diferencias en la metodología influyen en el comportamiento de las cepas estudiadas. La comparación entre las DOs alcanzadas por las bacterias adheridas a los pocillos en los caldos M9 y M63 mostró que los valores absolutos en M9 fueron 1,51 veces más altos que en M63, no obstante cuando se calcularon los índices FEB la diferencia disminuyó a 1,07 veces y además las desviaciones estándar eran menores en M63.

En un estudio previo Merritt et al. (1999) observaron que la cepa EcATCC no era capaz de adherirse y formar biopelícula en poliestireno cuando se cultivaba en un caldo rico (TSB). En nuestro experimento esa cepa se clasificó como no formadora o formadora débil en los medios ricos si se consideraba el índice FEB. Sin embargo esta misma cepa cultivada en uno de los medios ricos (MH-II) fue clasificada por los índices FB<sub>1</sub> y FB<sub>2</sub> como formadora moderada y fuerte, respectivamente.

Como resumen podemos decir que el proceso de formación de biopelícula por las cuatro cepas de *E. coli* estudiadas fue dependiente de la capacidad intrínseca de cada cepa pero fuertemente modulado por las condiciones de cultivo utilizadas y la fórmula aplicada para cuantificarla. Otros autores también han encontrado resultados que corroboran el impacto de diferentes condiciones en la formación de biopelícula por cepas de *E. coli* (Pratt y Kolter, 1998; Merritt et al., 1999; Reisner et al., 2006). Considerando nuestros resultados preliminares elegimos la metodología que permitía una mejor

discriminación entre la capacidad de formación de biopelícula, que presentaba resultados con menor desviación estándar y menor riesgo de contaminación, además de contemplar todas las variables del ensayo.

Con esta metodología se estudiaron 15 cepas de *E. coli*, detectándose una gran variación en la capacidad para formar biopelículas en las condiciones elegidas como también se ha descrito en estudios previos (Reisner et al., 2006; Ong et al., 2008; Ulett et al., 2007a; Ulett et al., 2007b). En nuestro experimento 7 cepas fueron clasificadas como formadoras fuertes y 8 como formadoras débiles de biopelícula.

El análisis de las imágenes obtenidas por microscopia confocal permitió comprobar que características como el grosor y la complejidad fueron mayores en las biopelículas de las cepas formadoras fuertes que en las formadoras débiles, lo que confirma que hay una buena correlación entre aspectos cuantitativos (grosor) y cualitativos (arquitectura de la biopelícula) y el índice FEB. En otro estudio también fue vista una correlación positiva entre la microscopía confocal y un ensayo de formación de biopelícula teñido con CV (Kanamaru et al., 2006).

En 14 cepas fue posible determinar el tipo de antígeno O, 12 cepas (85,7%) pertenecían a los serogrupos más comúnmente implicados en ITU (O1, O2, O6, O18, O25 y O75) (Johnson, 1991). Entre las siete cepas de *E. coli* formadoras fuertes de biopelícula predominaron las de los serogrupos O2 y O6. Otros autores encontraron que cepas de *E. coli* de los serogrupos O4 y O22 producían más biopelícula en poliestireno que las de los serogrupos O1, O16, O18 y O75 (Kanamaru et al., 2006). Pese a que detectamos diferencias estadísticas entre la formación fuerte de biopelícula en determinados

serogrupos (O6, O2 y O75) respecto a los demás, entendemos que es necesario estudiar un número más elevado de cepas para obtener resultados más concluyentes.

La movilidad ha sido descrita como una propiedad crítica para la formación de biopelícula por cepas de *E. coli* K12 (Pratt y Kolter, 1998; Van Houdt y Michiels, 2005), pero otros autores no observaron diferencias entre la formación de biopelículas por cepas móviles e inmóviles tanto UPEC como aisladas de bacteriuria asintomática (Hancock et al., 2006). En nuestro estudio tampoco fue vista una correlación significativa entre movilidad y formación de biopelícula en las cepas estudiadas.

Se ha atribuido a los antígenos polisacáridos capsulares K un papel indirecto en la inhibición de formación de biopelículas por ocultar adhesinas bacterianas (Schembri et al., 2004). Aparte se ha demostrado una acción directa antibiopelícula de antígenos polisacáridos capsulares del grupo II que son capaces de antagonizar la formación de biopelícula por cepas de *E. coli* y otros patógenos nosocomiales (Valle et al., 2006). En las 15 cepas de *E. coli* estudiadas, tres poseían el antígeno K1 (*neuC*) y fueron formadoras débiles de biopelícula, lo que sugiere una posible relación entre la presencia de este antígeno capsular y una menor capacidad de formación de biopelícula.

La actividad MRHA, fue la única de las características que expresan factores de virulencia asociados a la superficie bacteriana detectada con más frecuencia en las cepas formadoras fuertes de biopelículas. Esta prevalencia puede estar relacionada con el hecho de que esa actividad es debida a la expresión de las fimbrias P, S u otras, que son específicas de cepas patógenas que dispongan de un mayor conjunto de adhesinas necesarias para producir



patología en el tracto urinario (Blanco et al., 1990; Blanco et al., 1997a; Blanco et al., 1997b).

El gen *fimH*, que codifica la fimbria tipo 1, es considerado como un importante factor de promoción de adhesión, invasión y formación de biopelícula por cepas de *E. coli* (Andreu et al., 1997; Schembri et al., 2001; Emődy et al., 2003; Kaper et al., 2004; Schembri et al., 2004; Johnson et al., 2005). Las cepas que expresan este gen son capaces de producir hemaglutinación sensible a manosa (MSHA). En las 15 cepas, tanto la presencia del gen *fimH* (93,3%) como la actividad MSHA (66,7%) no fueron más frecuentes en las cepas formadoras fuertes de biopelículas.

En trabajos previos se ha detectado que el gen *papC* y sus diferentes alelos *papG*, *sfa/focDE* y *cnf1* fueron más frecuentes en cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con bacteriemia que en las cepas obtenidas de hisopos rectales de individuos sanos (Blanco et al., 1990; Sannes et al., 2004) y que los genes *papC*, *sfa/focDE* y *cnf1*, pero no el gen *fimH*, han sido encontrados con más frecuencia en cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con prostatitis, pielonefritis e ITU que en las cepas obtenidas de muestras de hisopo rectal de individuos sanos (Andreu et al., 1997; Blanco et al., 1997b; Johnson et al., 2002b; Johnson et al., 2003; Johnson et al., 2005).

Recientemente se ha descrito una asociación entre alta capacidad de formación de biopelícula y presencia de algunos genes de urovirulencia en cepas UPEC (Kanamaru et al., 2006). En nuestro estudio la correlación más importante detectada fue que los genes de virulencia *papC* y sus diferentes alelos *papG*, *sfa/focDE*, *focG*, *hlyA* y *cnf1* fueron mas prevalentes en las cepas formadoras fuertes de biopelícula que en las cepas formadoras débiles.

Notablemente, se encontró en nuestra investigación una buena correlación entre la capacidad de formar biopelículas y la coexistencia de al menos tres genes de virulencia (*pap*, *sfa/focDE*, *hlyA*, *cnf1*, *sat*, y *iroN*) considerados como clásicos de las cepas UPEC (Lloyd et al., 2007). Las combinaciones entre esos genes fueron más frecuentes en las cepas formadoras fuertes de biopelículas que en las débiles ( $p = 0,001$ ).

Se ha demostrado previamente que cepas de *E. coli* que expresan hemolisina y fimbrias tipo 1 son significativamente más eficaces para formar biopelículas *in vitro*, mientras que la misma relación no fue vista con respecto a aerobactinas (Soto et al., 2007). Los resultados de las 15 cepas están de acuerdo con esa correlación para hemolisina y aerobactinas, pero no para la expresión fenotípica de las fimbrias tipo 1.

La plasticidad genómica es responsable de la diversidad fenotípica y evolución de las cepas de *E. coli*. Su genoma es altamente dinámico y por tanto las cepas patógenas asociadas a infecciones humanas son muy diversas (Johnson et al., 2005; Brzuszkiewicz et al., 2006). Muchos de los genes asociados a virulencia están agrupados dentro de inserciones en el cromosoma bacteriano denominadas islas de patogenicidad (PAI) o en plásmidos que son comúnmente encontrados en el genoma de las cepas ExPEC, pero no en el genoma de cepas no patogénicas (Emődy et al., 2003; Kaper et al., 2004; Lloyd et al., 2007). Nosotros hemos encontrado una notable correlación entre la formación de biopelícula y ciertos genes de factores de virulencia usualmente agrupados en islas de patogenicidad (*pap* + *sfa/focDE* y *pap* + *hlyA* o *cnf1*). Estos resultados podrían indicar una alta aptitud patogénica de las cepas de *E. coli* formadoras fuertes de biopelícula, una vez que la combinación entre

factores de virulencia y una mayor capacidad de formar biopelículas puede aumentar el poder patógeno en las ITUs.

La asociación entre la formación de biopelícula y otros factores de virulencia ha sido variable. Algunos autores han encontrado una correlación positiva entre la formación de biopelícula con la presencia de fimbrias tipo 1, curli, movilidad, agn43, fimbrias tipo 3 y F9 en cepas de *E. coli* de laboratorio (Pratt y Kolter, 1998; Danese et al., 2000; Schembri y Klemm, 2001; Van Houdt y Michiels, 2005; Vianney et al., 2005; Ong et al., 2008; Ulett et al., 2007a; Ulett et al., 2007b). Sin embargo, otros autores no encontraron tal asociación en cepas de *E. coli* aisladas de muestras clínicas (Kanamaru et al., 2006; Reisner et al., 2006; Soto et al., 2007; Hancock et al., 2007). Esa discrepancia entre los resultados sugiere que las cepas ExPEC pueden comportarse de manera distinta a las cepas de *E. coli* de laboratorio, probablemente por diferencias existentes en el genoma.

Con el objeto de evaluar los efectos de algunos compuestos en la formación de biopelícula, elegimos las siete cepas de *E. coli* que en nuestras condiciones experimentales fueron fuertemente formadoras de biopelícula (Naves et al., 2008a).

Entre los tres compuestos estudiados, HSA se mostró como el más eficiente en la reducción de formación de biopelícula, con efectos inhibitorios a partir de la menor concentración probada (8 mg/L) en ambas condiciones experimentales para todas las cepas. En cuanto al mecanismo de acción se sabe que algunas proteínas disminuyen la formación de biopelículas en material abiótico dejando la superficie menos hidrofóbica (An y Friedman, 1998; Katsikogianni y Missirlis, 2004; Kinnari, et al., 2005). Albúmina, además, se une

a las células bacterianas creando un ambiente mucho menos hidrofóbico (An et al., 2000) lo que puede explicar su efecto inhibitorio en la capacidad de formación de biopelícula en superficies abióticas.

Ibuprofeno a concentración de 125 mg/L no inhibió el crecimiento de ninguna de las siete cepas de *E. coli* formadoras fuerte de biopelícula. Hay publicaciones contradictorias respecto a los efectos inhibitorios de IBU en el crecimiento de cepas de *E. coli* con MICs de 15 a 30 mg/L con ibuprofeno isobutanolamonio (Drago et al., 2002) a  $\geq 1.000$  mg/L con “ibuprofeno” (Cederlund and Mårdh, 1993). Por otro lado, IBU soluble a concentraciones  $\leq 125$ mg/L disminuyó la formación de biopelícula en cinco de las siete cepas de *E. coli*.

Cuando IBU fue probado con el tratamiento previo de las placas de poliestireno no se observó reducción en la formación de biopelícula, lo que sugiere que probablemente el compuesto no se adhirió al material abiótico y que podría haber sido lavado de los pocillos. Sin embargo, se observaron reducciones significativas en la formación de biopelícula por tres cepas usando HSA combinada con IBU cuando se compararon con los efectos de HSA sola, indicando que albúmina podría fijar IBU a superficies abióticas.

Otros autores han encontrado que concentraciones subinhibitorias de IBU inhiben la producción de fimbrias en cepas de *E. coli* disminuyendo su adhesión a células epiteliales del tracto urinario (Drago et al., 2002). Además, comprobaron que la hidrofobicidad de las células bacterianas y la producción de hemolisina también se afectan por la incubación con ese antiinflamatorio (Drago et al., 2002). Alem y Douglas (2004) detectaron un efecto antiadherente

del IBU en *Candida albicans* utilizando un sistema *in vitro* de discos de material de catéter.

Algunos estudios *in vivo* han descrito efectos sinérgicos en la combinación de IBU con antimicrobianos en la terapia de otitis neumocócica experimental (Diven et al., 1995; del Prado et al., 2006), y en un modelo murino de infección crónica pulmonar por *Pseudomonas aeruginosa* (Konstan et al., 1990). IBU podría inhibir la formación de biopelícula por *E. coli* en pacientes con sonda urinaria que reciben este antiinflamatorio, ya que las concentraciones urinarias de este compuesto, tras su administración a dosis estándar, son superiores a las necesarias para inhibir cinco de siete cepas de *E. coli* estudiadas (Chai et al., 1988).

NAC inhibió el crecimiento de todas las cepas de *E. coli* a 2.000 mg/L. Esa misma concentración ha sido descrita como inhibitoria de una variedad de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, incluyendo *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter cloacae* (Olofsson et al., 2003). Sin embargo, hay un trabajo en el cual siete cepas de *E. coli* no fueron inhibidas a la concentración de 1.500 mg /L de NAC (Cederlund and Mårdh, 1993).

Nuestro estudio demostró que concentraciones de NAC 4 a 250 veces menores a las necesarias para inhibir el crecimiento bacteriano fueron capaces de disminuir la formación de biopelícula en un rango aproximado de 20 a 40%. Otros autores han visto reducciones de la biopelícula de cepas de *E. coli* con 500 mg/L de NAC en el mismo rango que el observado por nosotros, con un máximo de reducción con 4.000 mg/L de NAC (Marchese et al., 2003). Cuando los resultados con NAC fueron examinados después del tratamiento previo de las placas de poliestireno, no se encontró inhibición de formación de biopelícula

por las cepas estudiadas, pero cuando se combinó con HSA potenció su efecto inhibitorio en cinco cepas.

NAC ha demostrado capacidad de reducir la adhesión bacteriana y también desprender bacterias adheridas a superficies (Mansouri and Darouiche, 2007). Ese compuesto asociado a fosfomicina y tigeciclina ha proporcionado una actividad sinérgica contra *E. coli* y estafilococos reduciendo significativamente la formación de biopelícula y la viabilidad de bacterias asociadas a las mismas (Marchese et al., 2003; Aslam et al., 2007). Según Marchese et al. (2003) las concentraciones de NAC en orina tras la administración de dosis habituales son mucho mayores que las necesarias para inhibir la formación de biopelícula por *E. coli* e incluso podría inhibir el crecimiento de algunas cepas. Por tanto, este compuesto podría tener interés tanto desde el punto de vista terapéutico como profiláctico en el manejo de las ITUs y sobre todo en las infecciones relacionadas con sondas urinarias.

En el estudio de la actividad de antimicrobianos frente a bacterias planctónicas y asociadas a biopelícula se observó que las cepas de *E. coli* formadoras fuertes de biopelícula fueron más susceptibles a los agentes antimicrobianos que las cepas formadoras débiles cuando crecían de manera planctónica. De las seis cepas productoras de betalactamasas solo dos fueron formadoras fuertes de biopelícula, mientras que las cuatro restantes fueron clasificadas como formadoras débiles. Gallant et al. (2005) han sugerido una posible relación inversa entre la producción de betalactamasas y la formación de biopelículas. En dicho estudio se observó que vectores plasmídicos conteniendo el marcador TEM-1 para betalactamasas causaban defectos en la

movilidad tipo *twitching* (mediada por pili tipo IV), en la adherencia y en la capacidad de formación de biopelículas en *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Considerando la formación de biopelícula como un factor de virulencia adicional, ese resultado parece estar de acuerdo con estudios anteriores que mostraban que cepas de *E. coli* con alto grado de resistencia a los antimicrobianos tendían a expresar un bajo grado de virulencia intrínseca (Jauréguy et al., 2007) y que cepas formadoras de biopelículas eran significativamente menos resistentes al ácido nalidíxico que las no formadoras (Soto et al., 2007).

En nuestro trabajo encontramos que los grados de inhibición alcanzados por las diferentes concentraciones de los antimicrobianos eran mucho menores para las bacterias asociadas a biopelículas que para las planctónicas. En las siete cepas estudiadas, las concentraciones de los antimicrobianos semejantes a las CMI's definidas por el criterio del CLSI fueron inhibitorias del 80% del crecimiento de las bacterias planctónicas mientras que en las bacterias asociadas a biopelículas las mismas concentraciones de los antimicrobianos no alcanzaban ese grado de inhibición. Otros trabajos también han demostrado que bacterias asociadas a biopelículas parecen ser mucho menos sensibles a la acción de los antimicrobianos que sus homólogas planctónicas (Jefferson, 2004; Sauer et al., 2007).

Está bien demostrado que la mayor resistencia en las bacterias asociadas a biopelículas es multifactorial, varía entre cepas, especies y se debe tanto a características fisiológicas individuales de las bacterias como a la ultraestructura de la biopelícula (Danese, 2002; Gorman y Jones, 2003; Rodríguez-Martínez y Pascual, 2007; Cegelski et al., 2008).

Los mecanismos de resistencia inherentes a las biopelículas son principalmente la baja permeabilidad a los fármacos, tasas alteradas de crecimiento bacteriano y el establecimiento de microambientes que antagonizan la acción de los antimicrobianos (Rodríguez-Martínez y Pascual, 2007). Mecanismos adicionales de resistencia podrían estar involucrados en la disminución de la acción de los antimicrobianos contra las bacterias asociadas a biopelículas (Jefferson, 2004; Sauer et al., 2007). Habitualmente las bacterias se vuelven más resistentes de forma inmediata después de adherirse a una superficie y esa resistencia aumenta con la maduración de la biopelícula. Bacterias asociadas a biopelículas pueden crecer muy despacio o incluso estar en un estado en el cual el crecimiento es casi ausente y como consecuencia hay una considerable reducción de la acción de los antimicrobianos que actúan fundamentalmente en fase de crecimiento bacteriano; además se sabe que bacterias en fase estacionaria son más resistentes a muchos antimicrobianos que en fase logarítmica (Gorman y Jones, 2003). Generalmente, los antimicrobianos que actúan contra cepas de *E. coli* en fase estacionaria de crecimiento también muestran algún efecto contra bacterias asociadas a biopelículas (Ashby et al., 1994).

En las siete cepas estudiadas fue observada una excelente correlación entre la sensibilidad de las bacterias planctónicas por los métodos de AB y microdilución del CLSI. Otros autores también encontraron una buena correlación entre ambas metodologías para microorganismos planctónicos de otras especies (Ramage et al. 2001; Pettit et al., 2005; Repp et al., 2007; Sarker et al., 2007). Las concentraciones de los antimicrobianos necesarias para la inhibición del 50 o el 80% del metabolismo del AB (CMI-AB<sub>50</sub> y CMI-



AB<sub>80</sub>) de las bacterias planctónicas fueron las mismas o mostraron solo una dilución de diferencia, lo que indica una pronunciada acción antimicrobiana contra el crecimiento planctónico.

No obstante, el mismo tipo de comparación hecha para las bacterias asociadas a biopelícula con las CMIB-AB<sub>50</sub> y CMIB-AB<sub>80</sub> muestra variaciones significativas entre los antimicrobianos. Para AMX no se detectó diferencias entre ambas concentraciones, con AMC solo dos cepas necesitaron concentraciones 16 veces mayores a la CMIB-AB<sub>50</sub> para que fuera alcanzada la CMIB-AB<sub>80</sub>, con CTX hubo diferencias de cuatro a ocho veces para tres cepas, pero las diferencias más acentuadas fueron detectadas para gentamicina y ciprofloxacina que necesitaron entre 16 y  $\geq 128$  veces la concentración de la CMIB-AB<sub>50</sub> para alcanzar la CMIB-AB<sub>80</sub>.

La determinación de los cocientes entre las concentraciones mínimas inhibitorias de los antimicrobianos frente a bacterias asociadas a biopelículas y planctónicas permitió observar que la eficacia de los antimicrobianos disminuyó en las bacterias asociadas a biopelículas para todas las cepas y todos los antimicrobianos y esta diferencia fue mayor si se consideraba la inhibición del 80%. Esta menor eficacia de los antimicrobianos contra bacterias asociadas a biopelícula encontrada en nuestro trabajo está de acuerdo con publicaciones previas que también muestran disminución del grado de sensibilidad en bacterias asociadas a biopelículas versus planctónicas de varios microorganismos (Donlan, 2002; Aslam, 2008).

Pettit et al. (2005) detectaron disminución de la eficacia antimicrobiana contra *Staphylococcus epidermidis* asociados a biopelículas con CMIBs > 4096 mg/L para gentamicina, bacitracina, vancomicina, enrofloxacina, ceftriaxona y

oxacilina. En otra publicación de nuestro grupo se demostró que entre cepas de *Corynebacterium urealyticum* las bacterias asociadas a biopelícula eran mucho menos sensibles al efecto bactericida de ciprofloxacina, moxifloxacina y vancomicina que bacterias planctónicas. Además la disminución de la eficacia del antimicrobiano no se pudo atribuir a la selección de mutantes resistentes ya que, cuando se estudiaron las CMI de las bacterias obtenidas de las biopelículas, se encontraron los mismos valores que sus equivalentes planctónicos (Soriano et al., 2008).

En un trabajo previo con la cepa *E. coli* ATCC 25922 se estudiaron los efectos de varios antimicrobianos contra bacterias planctónicas y asociadas a biopelícula. Las CMIBs para cefotaxima observadas en ese estudio coincidieron con las obtenidas en el presente trabajo, pero detectamos que fueron necesarias concentraciones más altas para gentamicina y ciprofloxacina, de 18 y 267 veces, respectivamente (Ashby et al., 1994). Esas discrepancias en los resultados podrían ser consecuencia de diferencias en el diseño experimental.

Olson et al. (2002) desarrollaron un modelo de estudio en el cual la concentración mínima erradicadora de biopelícula (CMEB) era definida como la menor concentración del antimicrobiano necesaria para la inhibición total de las bacterias asociadas a la misma. Hubo una considerable variación entre las cepas de *E. coli*, que fueron sensibles cuando crecían de manera planctónica a enrofloxacin, gentamicina, oxitetraciclina y trimetoprim/sulfametoxazol pero que expresaron grados variables de resistencia a estos antimicrobianos cuando se estudiaba las CMEBs que oscilaron entre < 2 a > 1024 mg/L. Los autores

sugirieron que, una vez establecida la biopelícula hay una considerable disminución de la eficacia de los antimicrobianos.

En otro estudio se han comparado las CMIs con las CMEBs de varios antimicrobianos frente a cepas de *E. coli* causantes de peritonitis. Se observó que todas las cepas fueron sensibles a cefotaxima y ciprofloxacina, y la mayoría a gentamicina, pero las cepas presentaron altas CMEBs en grados variables para cefotaxima y algunas para ciprofloxacina y gentamicina (Sepandj et al., 2004).

Los diferentes resultados encontrados en los distintos trabajos indican que las condiciones experimentales son fundamentales y es necesario estandarizarlas para que se pueda comparar la actividad *in vitro* de los antimicrobianos determinados por diferentes investigaciones.

## 6. CONCLUSIONES

1. La producción de biopelículas por *E. coli* sobre placas de poliestireno es un proceso método-dependiente por lo que es necesario definir claramente las condiciones experimentales en las que se realiza el estudio.
2. De las 15 cepas de *E. coli* estudiadas, siete (46,7%) fueron fuertemente productoras de biopelícula mientras que las restantes (53,3%) fueron clasificadas como formadoras débiles. Por microscopía confocal se comprobó el mayor grosor y complejidad de las biopelículas formadas por las primeras respecto a las segundas existiendo una excelente correlación entre grosor e índice Formación Específica de Biopelícula.
3. De los factores de virulencia asociados a la superficie bacteriana, la actividad MRHA fue la única que se correlacionó de manera significativa con fuerte formación de biopelícula.
4. Los genes de virulencia *papC*, alelos *papG*, *sfa/focDE*, *focG*, *hlyA* y *cnf1* así como determinadas islas de patogenicidad (*pap* + *sfa/focDE* y *pap* +

*hlyA* y/o *cnf1*) fueron más prevalentes en las cepas fuertemente productoras de biopelículas.

5. Albúmina sérica humana en solución redujo de forma muy importante la formación de biopelículas por parte de las cepas fuertemente productoras obteniéndose valores de concentración mínima inhibitoria de la biopelícula de 8 mg/L y reducciones entre el 93-100% de formación de biopelícula con concentraciones de 32.000 mg/L.
6. Ibuprofeno y N-acetil-L-cisteína redujeron la formación de biopelículas a concentraciones de 125 mg/L aunque no frente a todas las cepas y siempre en menor grado que el alcanzado por albúmina sérica humana.
7. La formación de biopelículas por cepas fuertemente productoras se redujo en un 70-96% cuando los pocillos de las placas de poliestireno fueron previamente tratados con 8 y 32.000 mg/L de albúmina sérica humana. El pre-tratamiento de los pocillos combinando albúmina sérica humana con N-acetil-L-cisteína o Ibuprofeno incrementó el efecto inhibitor de la albúmina sérica humana en cinco y tres de las siete cepas fuertemente productoras de biopelícula, respectivamente.
8. Los organismos asociados a biopelículas fueron mucho menos sensibles a la acción de los antibióticos que sus correspondientes células planctónicas.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- 1 Alamar Blue Technical Datasheet, Trek Diagnostic System, 2008.
- 2 Alem MAS, Douglas LJ. Effects of aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs on biofilms and planktonic cells of *Candida albicans*. Antimicrob Agents Chemoter 2004, 48: 41-47.
- 3 An YH, Blair BK, Martin KL, Friedman RJ. Macromolecule surface coating for preventing bacterial adhesion. In: Methods for evaluating attached bacterial and biofilms an overview. In: Handbook of Bacterial Adhesion: Principles, Methods, and Applications. An YH, Friedman RJ, Eds. Humana Press Inc. USA 2000: 213-233.
- 4 An YH, Friedman RJ. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. J Biomed Mater Res 1998, 43: 338-348.
- 5 Andreu A, Stapleton AE, Fennell C, Lockman HA, Xercavins M, Fernandez F, Stamm WE. Urovirulence determinants in *Escherichia coli* strains causing prostatitis. J Infect Dis 1997, 176: 464-469.
- 6 Aslam S, Trautner BW, Ramanathan V, Darouiche RO. Combination of tigecycline and N-acetylcysteine reduces biofilm-embedded bacteria on vascular catheters. Antimicrob Agents Chemother 2007, 51: 1556-1558.
- 7 Aslam S. Effect of antibacterials on biofilms. Am J Infect Control. 2008, 36: S175e9-S175e11.
- 8 Bahrani-Mougeot F, Gunther NW, Sonnenberg MS, Mobley HLT. Uropathogenic *Escherichia coli* in: *Escherichia Coli: Virulence Mechanisms of a Versatile Pathogen*. Sonnenberg MS, Ed. Elsevier Science Inc. USA 2002, 239-259.

- 9 Balaban N, Ren D, Givskov M, Rasmussen TB. Introduction. In: Control of biofilm infections by signal manipulation. Balaban N, Ed. Springer Series on Biofilms 2 USA 2008, 1-11.
- 10 Beloin C, Roux A, Ghigo JM. *Escherichia coli* biofilms. In: Bacterial biofilms. Romeo T, Ed. Curr Top Microbiol Immun 2008, 249-289.
- 11 Blanco J, Alonso MP, González EA, Blanco M, Garabal JI. VFs of bacteraemic *Escherichia coli* with particular reference to production of cytotoxic necrotising factor (CNF) by P-fimbriate strains. J Med Microbiol 1990, 31: 175-183.
- 12 Blanco J, Blanco M, Blanco JE, Mora A, Alonso MP, González EA, Bernárdez MI. Enterobacterias: características generales. Género *Escherichia* In: Manual de Microbiología Veterinaria, Vadillo S, Píriz S, Mateos E, Eds., McGraw-Hill Interamericana España 2002, 301-325.
- 13 Blanco M, Blanco JE, Alonso MP, Blanco J Virulence factors and O groups of *Escherichia coli* isolates from patients with acute pyelonephritis, cystitis and asymptomatic bacteriuria *Eur J Epidemiol* 1996, 12:191-198.
- 14 Blanco M, Blanco JE, Alonso MP, Mora A, Balsalobre C, Munoa F, Juarez A, Blanco J. Detection of *pap*, *sfa* and *afa* adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains: relationship with expression of adhesins and production of toxins. Res Microbiol 1997a, 148: 745-755.
- 15 Blanco M, Blanco JE, Rodríguez E, Abalia I, Alonso MP, Blanco J. Detection of virulence genes in uropathogenic *Escherichia coli* by polymerase chain reaction (PCR): comparison with results obtained using phenotypic methods. J Microbiol Method 1997b, 31: 37-43.
- 16 Branda S, Vik Å, Friedman L, Kolter R. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol* 2005, 13: 20-26.
- 17 Brown SA, Palmer KL, Whiteley M. Revisiting the host as a growth medium. Nature 2008, 6: 657-666.

- 18 Brzuszkiewicz E, Brüggemann H, Liesegang H, Emmerth M, Ölschläger T, Nagy G, Albermann K, Wagner C, Buchrieser C, Emödy L, Gottschalk G, Hacker J, Dobrindt U. How to become an uropathogen: Comparative genomic analysis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains. Proc Natl Acad Sci USA 2006, 34: 12879-12884.
- 19 Caraher E, Reynolds G, Murphy P, McClean S, Callaghan M. Comparison of antibiotic susceptibility of *Burkholderia cepacia* complex organisms when grown planktonically or as biofilm in vitro. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2006, 26:213-216.
- 20 Cederlund H, Mårdh PA. Antimicrobial activities of N-acetylcysteine and some non-steroidal anti-inflammatory drugs. J Antimicrob Chemother 1993, 32: 903-904.
- 21 Cegelski L, Marshall GR, Eldridge GR, Hultgren SJ. The biology and future prospects of antivirulence therapies. Nature 2008, 6: 17-27.
- 22 Cerca B, Martins S, Pier G, Oliveira R, Azevedo J. The relationship between inhibition of bacterial adhesion to a solid surface by sub-MICs of antibiotics and subsequent development of a biofilm. Res Microbiol 2005, 156: 650-655.
- 23 Chai BL, Minkler PE, Hoppel CL. Determination of ibuprofen and its major metabolites in human urine by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr 1988, 19: 93-101.
- 24 Chambers ST, Peddie B, Pithie A. Ethanol disinfection of plastic-adherent micro-organisms. J Hosp Infect 2006, 63: 193-196.
- 25 Christensen GD, Simpson WA, Anglen JO, Gainor BJ. Methods for evaluating attached bacterial and biofilms an overview. In: Handbook of Bacterial Adhesion: Principles, Methods, and Applications. An YH, Friedman RJ, Eds. Humana Press Inc. USA 2000: 213-233.
- 26 Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barret FF, Melton DM, Beachey EH. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. J Clin Microbiol 1985, 22: 996-1006.



- 27 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 16<sup>th</sup> Informational Supplement. CLSI document M100-S16. CLSI, Wayne, Pennsylvania, USA, 2006.
- 28 Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* 1999, 284:1318-1322.
- 29 Danese PN, Pratt LA, Dove SL, Kolter R. The outer membrane protein, antigen 43, mediates cell-to-cell interactions within *Escherichia coli* biofilms. *Mol Microbiol* 2000, 37: 424-432.
- 30 Danese PN. Antibiofilm approaches: prevention of catheter colonization. *Chem Biol* 2002, 9: 873-880.
- 31 del Prado G, Martínez-Marín C, Huelves L, Gracia M, Rodríguez-Cerrato V, Fernández-Roblas R, Ponte MC, Cenjor C, Soriano F. Impact of ibuprofen therapy in the outcome of experimental pneumococcal acute otitis media treated with amoxicillin or erythromycin. *Pediatr Res* 2006, 60: 555-559.
- 32 Diven WF, Evans RW, Alper C, Burckart GJ, Jaffe R, Doyle WJ. Treatment of experimental acute otitis media with ibuprofen and ampicillin. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 1995, 33: 127-139.
- 33 Dobrindt U, Hacker J. Targeting virulence traits: potencial strategies to combat extraintestinal pathogenic *E. coli* infections. *Curr Opin Microbiol* 2008, 11: 409-413.
- 34 Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002, 15: 167-193.
- 35 Donlan RM. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 2002, 8: 881-889.
- 36 Donnenberg MS. Introduction. In: *Escherichia Coli: Virulence Mechanisms of a Versatile Pathogen*. Elsevier Science Inc. USA 2002, xxi-xxv.

- 37 Drago L, Vecchi E, Nicola L, Valli M, Gismondo MR. Effects of subinhibitory concentrations of ibuprofen isobuthanolammonium on virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*. J Chemother 2002, 14: 314-315.
- 38 Dunne Jr WM. Bacterial adhesion: Seen any good biofilms lately? Clin Microbiol Rev 2002, 15: 155-166.
- 39 Emödy L, Kerényi M, Nagy G. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*. Int J Antimicrob Agents 2003, 22: 29-33.
- 40 Frank KL, Reichert EJ, Piper KE, Patel R. In vitro effects of antimicrobial agents on planktonic and biofilm forms of *Staphylococcus lugdunensis* clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother 2007, 51: 888-895.
- 41 Gallant CV, Daniels C, Leung JM, Ghosh AS, Young KD, Kotra LP, Burrows LL. Common beta-lactamases inhibit bacterial biofilm formation. Mol Microbiol 2005, 58: 1012-1024.
- 42 Goller CC, Romeo T. Environmental influences on biofilm development. In: Bacterial biofilms. Romeo T, Ed. Curr Top Microbiol Immun 2008, 37-66.
- 43 Gorman SP, Jones DS. Biofilm complications of urinary tract devices. In: Medical Implications of Biofilms. Wilson M, Devine D, Eds. Cambridge University Press UK, 2003, 136-170.
- 44 Gualtieri M, Bastide L, Villain-Guillot P, Michaux-Charachon S, Latouche J, Leonetti JP. In vitro activity of a new antibacterial rhodanine derivative against *Staphylococcus epidermidis* biofilms J Antimicrob Chemother 2006, 58: 778-783.
- 45 Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. Nature 2004, 2: 95-108.
- 46 Hancock V, Ferrières L, Klemm P. Biofilm formation by asymptomatic and virulent urinary tract infectious *Escherichia coli* strains. FEMS Microbiol Lett 2007, 267: 30-37.

- 47 Harrison JJ, Ceri H, Yerly J, Stremick CA, Hu Y, Martinuzzi R, Turner RJ. The use of microscopy and three-dimensional visualization to evaluate the structure of microbial biofilms cultivated in the Calgary Biofilm Device. *Biol Proced Online* 2006, 8: 194-215.
- 48 Hatt JK, Rather PN. Role of bacterial biofilms in urinary tract infections. In: *Bacterial biofilms*. Romeo T, Ed. *Curr Top Microbiol Immun* 2008, 163-191.
- 49 Ilstrup D. Statistical methods in microbiology. *Clin Microbiol Rev* 1990, 3 : 219-226.
- 50 Jacobsen SM, Stickler DJ, Mobley HLT, Shirtliff ME. Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Clin Microbiol Rev* 2008, 21: 26-58.
- 51 Jauréguy F, Carbonnelle E, Bonacorsi S, Clec'h C, Casassus P, Bingen E, Picard B, Nassif X, Lortholary O. Host and bacterial determinants of initial and outcome of *Escherichia coli* sepsis. *Clin Microbiol Infect* 2007, 13: 854-862.
- 52 Jefferson KK. What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol Lett* 2004, 236: 163-173.
- 53 Jiang X, Pace JL. Microbial biofilms. In: *Biofilms, infection, and antimicrobial therapy*. Pace JL, Rupp M, Finch RG, Eds. CRC Press, USA, 2006, 3-19.
- 54 Johnson JR, Kaster N, Kuskowski MA, Ling GV. Identification of urovirulence traits in *Escherichia coli* by comparison of urinary and rectal *E. coli* isolates from dogs with urinary tract infection. *J Clin Microbiol* 2003, 41: 337-345.
- 55 Johnson JR, Kuskowski MA, O'Bryan TT, Maslow JN. Epidemiological correlates of virulence genotype and phylogenetic background among *Escherichia coli* blood isolates from adults with diverse-source bacteremia. *J Infect Dis*. 2002b, 15: 1439-1447.

- 56 Johnson JR, Owens K, Gajewski A, Kuskowski MA. Bacterial characteristics in relation to clinical source of *Escherichia coli* isolates from women with acute cystitis or pyelonephritis and uninfected women. J Clin Microbiol 2005, 43: 6064-6072.
- 57 Johnson JR, Stell AL. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. J Infect Dis 2000, 181: 261-272.
- 58 Johnson JR. Evolution of pathogenic *Escherichia coli*. In: *Escherichia coli*: Virulence mechanisms of a versatile pathogen. Donnenberg MS, Ed. Elsevier Science Inc. USA 2002a, 55-77.
- 59 Johnson JR. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. Clin Microbiol Rev 1991, 4: 80-128.
- 60 Jubelin G, Dorel C, Lejeune P. Role of biofilms in infections caused by *Escherichia coli*. In: Biofilms, infection, and antimicrobial therapy. Pace JL, Rupp M, Finch RG, Eds. CRC Press USA 2006, 73-80.
- 61 Kadurugamuwa JL, Sin L, Albert E, Yu J, Francis K, DeBoer M, Rubin M, Bellinger-Kawahara C, Parr Jr TR, Contag PR. Direct continuous method for monitoring biofilm infection in a mouse model. Infect Immun 2003, 71: 882-890.
- 62 Kanamaru S, Kurazono H, Terai A, Monden K, Kumon H, Mizunoe Y, Ogawa O, Yamamoto S. Increased biofilm formation in *Escherichia coli* isolated from acute prostatitis. Int J Antimicrob Agents 2006, 28S: 21-25.
- 63 Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. Nature 2004, 2:123-140.
- 64 Katsikogianni M, Missirlis YF. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-materials interactions. Euro Cells Mater 2004, 8: 37-57.
- 65 Kau AL, Hunstad DA, Hultgren SJ. Interaction of uropathogenic *Escherichia coli* with host uroepithelium. Curr Opin Microbiol 2005, 8: 54-59.

- 66 Kinnari TJ, Peltonen LI, Kuusela P, Kiviahti J, Kononen M, Jero J. Bacterial adherence to titanium surface coated with human serum albumin. *Otol. & Neurot.* 2005, 26: 380-384.
- 67 Konstan MW, Vargo KM, Davis PB. Ibuprofen attenuates the inflammatory response to *Pseudomonas aeruginosa* in a rat model of chronic pulmonary infection. Implications for anti-inflammatory therapy in cystic fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 1990, 141: 186-192.
- 68 Lindsay D, von Holy A. Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. *J Hosp Infect* 2008, 64: 313-325.
- 69 Lloyd AL, Rasko DA, Mobley HLT Defining genomic islands and uropathogen-specific genes in uropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2007, 189: 3532-3546.
- 70 Mansouri MD, Darouiche RO. In vitro antimicrobial activity of N-acetylcysteine against bacteria colonising central venous catheters. *Int J Antimicrob Agents* 2007, 29: 471-483.
- 71 Marchese A, Micaela B, Gualco L, Debbia EA, Schito GC, Schito AM. Effect of fosfomycin alone and in combination with N-acetylcysteine on *E. coli* biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 2003, 22: S95-S100.
- 72 Marra A. Targeting virulence for antibacterial chemotherapy. Identifying and characterising virulence factors for lead discovery. *Drugs R D* 2006, 7: 1-16.
- 73 Merritt K, Hitchins VM, Brown SA. Safety and cleaning of medical materials and devices. FDA, Center for Devices and Radiological Health, Division of Life Sciences 1999, 131: 136.
- 74 Moulin-Schouleur M, Schouler C, Tailliez P, Kao MR, Brée A, Germon P, Oswald E, Mainil J, Blanco M, Blanco J. Common virulence factors and genetic relationships between O18:K1:H7 *Escherichia coli* isolates of human and avian origin. *J Clin Microbiol* 2006, 44: 3484-3492.
- 75 Mysorekar IU, Hultgren SJ. Mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli* persistence and eradication from the urinary tract. *Proc Natl Acad Sci*

USA 2006, 103: 14170-14175.

- 76 Narisawa N, Furukawa S, Ogiwara H, Yamasaki M. Estimation of the biofilm formation of *Escherichia coli* K-12 by the cell number. *J Biosci Bioeng* 2005, 99: 78-80.
- 77 Naves P, del Prado G, Huelves L, Gracia M, Ruiz V, Blanco J, Dhahi G, Blanco M., Ponte MC, Soriano F. Correlation between virulence factors and in vitro biofilm formation by *Escherichia coli* strains. *Microb. Pathogen.* 2008a, 45: 86-91.
- 78 Naves P, del Prado G, Huelves L, Gracia M, Ruiz V, Blanco J, Rodríguez-Cerrato V, Ponte MC, Soriano F. Measurement of biofilm formation by clinical isolates of *Escherichia coli* is method-dependent. *J Appl Microbiol* 2008b, 105: 585-590.
- 79 Nicolas-Chanoine MH, Blanco J, Leflon-Guibout V, Demarty R, Alonso MPM, Caniça M, Park YJ, Lavigne JP, Pitout J, Johnson JR. Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother* 2007, 61: 273-281.
- 80 Niu C, Gilbert ES. Colorimetric method for identifying plant essential oil components that affect biofilm formation and structure. *Appl Environ Microbiol* 2004, 70: 6951-6956.
- 81 Oelschlaeger TA, Dobrindt U, Hacker J. Virulence factors of uropathogens. *Curr Opin Urol* 2002, 12: 33-38.
- 82 Olofsson AC, Hermansson M, Elwing H. *N*-Acetyl-L-Cysteine affects growth, extracellular polysaccharide production, and bacterial biofilm formation on solid surfaces. *Appl Environ Microbiol* 2003, 69: 4814-4822.
- 83 Olson ME, Ceri H, Morck DW, Buret AG, Read RR. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can J Vet Res* 2002, 66: 86-92.

- 84 Ong CLY, Ulett GC, Mabbett AN, Beaston SA, Webb RI, Monaghan W, Nimmo GR, Looke DF, McEwan AG, Schembri MA. Identification of type 3 fimbriae in uropathogenic *Escherichia coli* reveals a role in biofilm formation. J Bacteriol 2008, 190:1054-1063.
- 85 Palmer J, Flint S, Brooks J. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. J Ind Microbiol Biotechnol 2007, 34: 577-588.
- 86 Parsek MR, Fuqua C. Biofilms 2003: Emerging themes and challenges in studies of surface-associated microbial life. J Bacteriol 2004, 186: 4427-4440.
- 87 Pátri E, Szabó E, Pál T, Emődy L. Thin aggregative fimbriae on urinary *Escherichia coli* isolates. In: Genes and proteins underlying microbial urinary tract virulence: Basic aspects and applications. Emődy L, Pál T, Hacker J, Blum-Oehler, Eds. Kluwer Academic Publishers, 2000, 219-224.
- 88 Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. Comparisons of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. J Microbial Methods 2008, 72: 157-165.
- 89 Pettit RK, Weber CA, Kean MJ, Hoffmann H, Pettit GR, Tan R, Franks KS, Horton ML. Microplate Alamar Blue Assay for *Staphylococcus epidermidis* biofilm susceptibility testing. Antimicrob Agents Chemother 2005, 49:2612-2617.
- 90 Pitts B, Hamilton MA, Zelter N, Stewart PS. A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. J Microbial Methods 2003, 54: 269-276.
- 91 Pratt LA, Kolter R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. Mol Microbiol 1998, 30: 285-293.
- 92 Prescott LM, Harley JP, Klein DA. Microbiology 5th edition. McGraw-Hill, USA 2002.

- 93 Prüss BM, Besemann C, Denton A, Wolfe J. A complex transcription network controls the early stages of biofilm development by *Escherichia coli*. J Bacteriol 2006, 188: 3731-3739.
- 94 Ramage G, Walle KV, Wickes BL, López-Ribot, JL. Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. Antimicrob Agents Chemother 2001, 45:2475-2479.
- 95 Reisner A, Krogfelt KA, Klein BM, Zechner EL, Molin S. In vivo biofilm formation of commensal and pathogenic *Escherichia coli* strains: Impact of environmental and genetic factors. J Bacteriol 2006, 188: 3572-3581.
- 96 Reisner A, Tøiby N, Tolker-Nielsen T, Molin S. Microbial pathogenesis and biofilm development. In: Concepts in bacterial virulence. Russel W, Herwald H, Eds. Contrib Microbiol Basel, Karger 2005, 12: 114-131.
- 97 Repp KK, Menor SA, Pettit KK. Microplate Alamar Blue Assay for susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. Med Mycol 2007, 45:603-607.
- 98 Rodríguez-Martínez JM, Pascual A. Actividad de los antimicrobianos en biocapas bacterianas. Enferm Infecc Microbiol Clin 2008, 26: 107-114.
- 99 Roos V, Nielsen EM, Klemm P. Asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli* strains: adhesions, growth and competition. FEMS Microbiol Lett 2006a, 262:22-30.
- 100 Roos V, Schembri MA, Ulett GC, Klemm P. The asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli* strain 83972 out-competes UPEC strains in human urine. Infect Immun 2006b, 74: 615-624.
- 101 Russo TA, Johnson JR. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. Microbes and Infection 2003, 5: 449-456.
- 102 Sandoe JAT, Wysome J, West AP, Heritage J, Wilcox MH. Measurement of ampicillin, vancomycin, linezolid and gentamicin activity against enterococcal biofilms. J Antimicrob Chemother 2006, 57: 767-770.



- 103 Sannes MR, Kuskowski MA, Owens K, Gajewski A, Johnson JR. Virulence factor profiles and phylogenetic background of *Escherichia coli* isolates from veterans with bacteremia versus uninfected control patients. J Infect Dis 2004, 190: 2121-2128.
- 104 Sarker SD, Nahar L, Kumarasamy. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. Methods 2007, 42: 321-324.
- 105 Sauer K, Rickard AH, Davies DG. Biofilm and biocomplexity. Microbe 2007, 7: 347-353.
- 106 Schembri MA, Dalsgaard D, Klemm P. Capsule shields the function of short bacterial adhesins. J Bacteriol 2004, 186: 1249-1257.
- 107 Schembri MA, Klemm P. Biofilm formation in a hydrodynamic environment by novel *FimH* variants and ramifications for virulence. Infect Immun 2001, 69: 1322-1328.
- 108 Scheutz F, Strockbine NA. Genus I. *Escherichia* Castellani and Chalmers 1919, 941T<sup>AL</sup> In: Bergey's Manual of systematic bacteriology. Second edition, volume two. Garrity GM, Ed., Bergey's Manual Trust USA 2005, 607-624.
- 109 Schmoll T, Ott M, Oudega B, Hacker J. Use of a wild-type gene fusion to determine the influence of environmental conditions on expression of the S fimbrial adhesion in an *Escherichia coli* pathogen. J Bacteriol 1990, 172: 5103-5111.
- 110 Sepandj F, Ceri H, Giba A, Read R, Olson M. Minimum inhibitory concentration (MIC) versus minimum biofilm eliminating concentration (MBEC) in evaluation of antibiotic sensitivity of Gram-negative bacilli causing peritonitis. Perit Dial Int 2004, 24: 65-67.
- 111 Skyberg JA, Siek KE, Doetkott C, Nolan LK. Biofilm formation by avian *Escherichia coli* in relation to media, source and phylogeny. J Appl Microbiol 2006, 102: 548-554.

- 112 Smith JL, Fratamico PM, Gunther NW. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. Foodborne Pathog Dis 2008, 4: 134-162.
- 113 Soriano F, Huelves L, Naves P, Rodríguez-Cerrato V, del Prado G, Ruiz V, Ponte MC. In vitro activity of ciprofloxacin, moxifloxacin, vancomycin and erythromycin against planktonic and biofilm forms of *Corynebacterium urealyticum*. J Antimicrob Chemother 2008,
- 114 Soto SM, Smithson A, Horcajada JP, Martinez JA, Mensa JP, Vila J. Implication of biofilm formation in the persistence of urinary tract infection caused by uropathogenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Infect 2006, 12: 1034-1036.
- 115 Soto SM, Smithson A, Martinez JA, Horcajada JP, Mensa J, Vila J. Biofilm formation in Uropathogenic *Escherichia coli* strains: Relationship with prostatitis, urovirulence factors and antimicrobial resistance. J Urol 2007, 177: 365-368.
- 116 Sousa CP. The versatile strategies of *Escherichia coli* pathotypes: a mini review. J Venom Anim Toxins incl Trop Dis 2006, 12: 363-373.
- 117 Tenke P, Kovacs B, Jäckel M, Nagy E. The role of biofilm infection in urology. World J Urol 2006, 24: 13-20.
- 118 Todar K. Pathogenic *E. coli* in: Online textbook of bacteriology. <http://textbookofbacteriology.net/e.coli.html> USA, 2008.
- 119 Trautner BW, Daruoiche RO. Role of biofilm in catheter-associated urinary tract infection. Am J Infect Control 2004, 32: 177-183.
- 120 Trautner BW, Hull RA, Thornby JI, Darouiche RO. Coating urinary catheters with an avirulent strain of *Escherichia coli* as a means to establish asymptomatic colonization. Infect Control Hosp Epidemiol 2007, 28: 92-94.
- 121 Ulett GC, Mabbett AN, Fung KC, Webb RI, Schembri MA. The role of F9 fimbriae of uropathogenic *Escherichia coli* in biofilm formation. Microbiology 2007a, 151: 2321-2331.

- 122 Ulett GC, Valle J, Beloin C, Sherlock O, Ghigo JM, Schembri MA. Functional analysis of antigen 43 in uropathogenic *Escherichia coli* reveals a role in long-term persistence in the urinary tract. *Infect Immun* 2007, 75: 3233-3244.
- 123 Uzcudun IL. Biofilms bacterianos. *Temas de actualidad SEM* 2004, 37: 14-18.
- 124 Valle J, Da Re S, Henry N, Fontaine T, Balestrino D, Latour-Lambert P, Ghigo JM. Broad-spectrum biofilm inhibition by a secreted bacterial polysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, 33: 12558-12563.
- 125 Van Houdt R, Michiels CW. Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Res Microbiol* 2005, 156: 626-633.
- 126 Vianney A, Jubelin G, Renault S, Dorel C, Lejeune P, Lazzaroni JC. *Escherichia coli tol* and *rsc* genes participate in the complex network affecting curli synthesis. *Microbiology* 2005, 151: 2487-2497.
- 127 Vila J, Soriano A, Mensa J. Bases moleculares de la adherencia microbiana sobre los materiales protésicos. Papel de las biocapas en las infecciones asociadas a los materiales protésicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008, 26: 48-55.
- 128 Yang HH, Vinopal RT, Grasso D, Smets BF. High diversity among environmental *Escherichia coli* isolates from a bovine feedlot. *Appl Environ Microbiol* 2004, 70: 1528-1536.

## LISTA DE PUBLICACIONES ORIGINALES

Esta tesis doctoral se ha presentado según el formato de publicaciones y ha dado lugar a un conjunto de publicaciones originales enumeradas a continuación. En todas las publicaciones el autor de esta tesis doctoral es el primer autor, con la salvedad de la publicación III, siendo partícipe del diseño experimental, de los análisis de los resultados y de la elaboración del manuscrito.

[doi>](#) NAVES, P. L. F. ; PRADO, G. ; HUELVES, L. ; GRACIA, M. ; RUIZ, V. ; BLANCO, J. ; RODRIGUEZ-CERRATO, V. ; PONTE, M. C. ; SORIANO, F. . Measurement of biofilm formation by clinical isolates of *Escherichia coli* is method-dependent. Journal of Applied Microbiology [JCR](#), v. 105, p. j.1365-2672.200, 2008.

[doi>](#) NAVES, P. L. F. ; PRADO, G. ; HUELVES, L. ; GRACIA, M. ; RUIZ, V. ; BLANCO, J. ; DAHBI, G. ; BLANCO, M. ; PONTE, M. C. ; SORIANO, F. . Correlation between virulence factors and in vitro biofilm formation by *Escherichia coli* strains. Microbial Pathogenesis [JCR](#), v. 03.003, p. j.micpath.2008., 2008.

[doi>](#) SORIANO, F. ; HUELVES, L. ; NAVES, P. L. F. ; RODRIGUEZ-CERRATO, V. ; del Prado, G. ; RUIZ, V. ; Ponte, C. . In vitro activity of ciprofloxacin, moxifloxacin, vancomycin and erythromycin against planktonic and biofilm forms of *Corynebacterium urealyticum*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy [JCR](#), v. 63, p. 353-356, 2008.